



Potencial biotecnológico de *Yarrowia lipolytica* para a produção de lipase em fermentação no estado sólido utilizando frutos nativos da Amazônia

Raíssa de Carvalho Pinto e Rocha

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Prof^ª. DSc Maria Alice Zarur Coelho

DSc Carlos Eduardo Conceição de Souza

Janeiro de 2020

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *YARROWIA*
LIPOLYTICA PARA A PRODUÇÃO DE LIPASE EM
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
FRUTOS NATIVOS DA AMAZÔNIA**

RAÍSSA DE CARVALHO PINTO E ROCHA

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheira Química.

Aprovado por:

Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.

Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc.

Verônica Regina de Oliveira Lopes, D.Sc.

Orientado por:

Prof. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Carlos Eduardo Conceição de Souza, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Janeiro de 2020

Rocha, Raíssa de Carvalho Pinto e.

Potencial biotecnológico de *Yarrowia lipolytica* para a produção de lipase em fermentação em estado sólido utilizando frutos nativos da Amazônia / Raíssa de Carvalho Pinto e Rocha. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2020.

x, 76 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2020.

Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Carlos Eduardo Conceição de Souza.

1. *Yarrowia lipolytica*. 2. Lipase. 3. Fermentação no estado sólido. 4. Monografia.

(Graduação – UFRJ/EQ). 5. Maria Alice Zarur Coelho e Carlos Eduardo Conceição de Souza. I. Potencial biotecnológico de *Yarrowia lipolytica* para a produção de lipase em fermentação em estado sólido utilizando frutos nativos da Amazônia.

Dedido este trabalho aos meus pais, Abigail e Renato, por todo amor e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo carinho e suporte. Por terem me proporcionado o estudo e me ensinado que a dedicação e a perseverança são fundamentais, e ainda, por terem me apoiado a longo de toda a graduação.

À minha irmã, Talissa Rocha, por dividir a vida inteira comigo, estar presente nos momentos bons e ruins, pelo incentivo e cuidado de sempre.

Aos meus companheiros de jornada Wesley Garcia, Bruna Oliveira, Klinsmann Winter, Letícia Vechi, Maryanna Soledade, Leonardo Miranda, Luiz Aires e Camila Grangeia. Obrigada por tornarem esses anos de Escola de Química mais leves e divertidos, por terem dividido momentos e conhecimentos e por terem me escutado e aconselhado nos momentos difíceis.

À minha amiga Beatriz Malafaia, por estar presente na minha vida desde quando eu ainda nem sabia o que queria fazer dela e por me apoiar e motivar em todas as escolhas do caminho.

Obrigada ao Jorge Bezerra, por todas as palavras de apoio e carinho, por ouvir minhas histórias e reclamações e dividir tantos momentos. Agradeço, principalmente, por acreditar no meu potencial até quando eu mesma não tenho tanta certeza dele.

Agradeço à Enactus UFRJ por ter sido luz quando eu mais precisei. Obrigada por ter me trazido tantos amigos e conhecimentos, por me lembrar que eu sou pequenininha, mas que, mesmo assim, posso ter em mim todos os sonhos do mundo.

Ao grupo Biose pela ajuda e suporte durante todo o período de iniciação científica. Obrigada pelas conversas, conselhos, ideias e exemplos quando eu ainda estava chegando ao ambiente da faculdade.

Agradeço aos meus orientadores Maria Alice Coelho e Carlos Eduardo Souza, pelo direcionamento e suporte dados a esse trabalho.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheira Química.

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *YARROWIA LIPOLITICA* PARA A PRODUÇÃO DE LIPASE EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO FRUTOS NATIVOS DA AMAZÔNIA

Raíssa de Carvalho Pinto e Rocha

Janeiro, 2020

Orientadores: Prof. DSc Maria Alice Zarur Coelho.

DSc Carlos Eduardo Conceição de Souza.

Lipases são biocatalisadores que possuem elevado valor agregado e por serem produtos de interesse industrial, sendo que cada vez mais tem-se estudado a produção dessas biomoléculas no Brasil. Essas enzimas são capazes de catalisar reações como a hidrólise de triacilgliceróis, esterificação, transesterificação, aminólise, alcóolise, acidólise e lactonização, e por tal versatilidade possuem ampla aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, química e de combustíveis. Sua produção ocorre majoritariamente por meio do uso de microrganismos como leveduras e bactérias, que produzem a enzima intracelularmente ou as liberam para o meio extracelular, podendo utilizar uma ampla gama de substratos (proteínas, lipídeos e carboidratos) e também diferentes tipos de fermentação (submersa ou no estado sólido). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* utilizando como matéria-prima as tortas de andiroba e cupuaçu e o farelo de soja, considerados co-produtos na agroindústria. Inicialmente, essas matérias-primas foram usadas separadamente para a comparação da atividade enzimática e produtividade. Nesse cenário, a torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja se mostrou mais vantajosa e, por isso, foi adotada numa etapa posterior, em que pretendeu-se avaliar a alteração de parâmetros como a umidade e a suplementação externa para a melhoria da atividade enzimática. O meio de cultivo contendo 2% de peptona, 60% de umidade e 3 mL de inóculo apresentou maior atividade lipolítica (103,8 U/g) e concluiu-se que os suplementos peptona e ureia foram significantes para a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*. Além disso, o modelo estatístico utilizado calculou como concentrações ideais para obtenção de maior atividade enzimática 1,6% de peptona, 1,9% de ureia e 2,3% de óleo de soja.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da distribuição da Floresta Amazônica na América do Sul.....	4
Figura 2: Cupuaçuzeiro e corte ortogonal do cupuaçu.....	7
Figura 3: Adirobeira e fruto andiroba.....	9
Figura 4: Vagem de soja na fase madura.....	10
Figura 5: Reação genérica de transesterificação.....	12
Figura 6: Microscopia ótica de cepa de <i>Yarrowia lipolytica</i>	14
Figura 7: Número de artigos publicados por ano com a palavra-chave “lipase”.....	28
Figura 8: Número de patentes reconhecidas por ano com a palavra-chave “lipase”.....	28
Figura 9: Número de artigos publicados por país com a palavra-chave “lipase”.....	29
Figura 10: Número de patentes reconhecidas por banco com a palavra-chave “lipase”.....	30
Figura 11: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “yarrowia + lipolityca”.....	30
Figura 12: Número de patentes reconhecidas por ano com as palavras-chave “yarrowia + lipolityca”.....	31
Figura 13: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “yarrowia + lipolityca”.....	32
Figura 14: Número de patentes reconhecidas por banco com as palavras-chave “yarrowia + lipolityca”.....	32
Figura 15: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “solid + state + fermentation”.....	33
Figura 16: Número de patentes reconhecidas por ano com as palavras-chave “solid + state + fermentation”.....	33
Figura 17: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “solid + state + fermentation”.....	34
Figura 18: Número de patentes reconhecidas por banco com as palavras-chave “solid + state + fermentation”.....	34
Figura 19: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca”.....	35
Figura 20: Número de patentes reconhecidas por ano com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca”.....	35
Figura 21: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca”.....	36
Figura 22: Número de patentes reconhecidas por banco com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca”.....	37
Figura 23: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca + solid + state + fermentation”.....	37
Figura 24: Número de patentes reconhecidas por ano com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca + solid + state + fermentation”.....	38

Figura 25: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca + solid + state + fermentation”	38
Figura 26: Número de patentes reconhecidas por banco com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca + solid + state + fermentation”	39
Figura 27: Perfil de pH em 48 horas de fermentação em torta de andiroba adicionada de farelo de soja	48
Figura 28: Perfil de pH em 48 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja	49
Figura 29: Perfil de pH em 36 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja e suplementação externa	50
Figura 30: Perfil de umidade em 48 horas de fermentação em torta de andiroba adicionada de farelo de soja	51
Figura 31: Perfil de umidade em 48 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja	51
Figura 32: Perfil de umidade em 36 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja e suplementação externa	52
Figura 33: Atividade lipolítica e produtividade após 48 horas de fermentação em torta de cupuaçu	53
Figura 34: Atividade lipolítica e produtividade após 48 horas de fermentação em torta de andiroba	54
Figura 35: Atividade lipolítica e produtividade após 48 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja	55
Figura 36: Atividade proteolítica e produtividade em 36 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja	56
Figura 37: Atividade lipolítica e produtividade após 48 horas de fermentação em torta de andiroba adicionada de farelo de soja	57
Figura 38: Atividade proteolítica e produtividade em 36 horas de fermentação em torta de andiroba adicionada de farelo de soja	58
Figura 39: Diagrama de Pareto obtido no Planejamento Experimental Fatorial Fracionário	61
Figura 40: Superfície de resposta da atividade lipolítica em função das concentrações de uréia (%) e peptona (%) pelo DCCR para a fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja	63
Figura 41: Superfície de resposta da atividade lipolítica em função das concentrações de óleo de soja (%) e peptona (%) pelo DCCR para a fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja	63
Figura 42: Superfície de resposta da atividade lipolítica em função das concentrações de óleo de soja (%) e uréia (%) pelo DCCR para a fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Análise bromatológica do cupuaçu.....	8
Tabela 2: Composição do óleo de soja.....	11
Tabela 3: Produtos que podem ser obtidos por fermentação no estado sólido a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos.....	20
Tabela 4: Descrição de substratos naturais e microrganismos envolvidos na fermentação no estado sólido para a produção de lipases.....	22
Tabela 5: Parâmetros utilizados em cada etapa fermentativa.....	41
Tabela 6: Intervalos de tempo de fermentação avaliados em cada etapa fermentativa.....	42
Tabela 7: Parâmetros variáveis no planejamento experimental fatorial fracionário....	43
Tabela 8: Parâmetros variáveis no delineamento composto central rotacional.....	44
Tabela 9: Composição centesimal, fibras totais e valor calórico total das tortas de cupuaçu e andiroba.....	47
Tabela 10: Composição centesimal, fibras totais e valor calórico total do farelo de soja.....	48
Tabela 11: Parâmetros e atividade lipolítica em cada ensaio do planejamento experimental fatorial fracionário.....	60
Tabela 12: Parâmetros e atividade lipolítica em cada ensaio do delineamento composto central rotacional.....	62
Tabela 13: Composição ideal predita pelo DCCR para cada um dos parâmetros avaliados.....	65

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Amazônia.....	4
3.2. Frutos amazônicos.....	5
3.2.1. Cupuaçu.....	6
3.2.2. Andiroba.....	8
3.3. Soja.....	9
3.4. <i>Yarrowia lipolytica</i>	12
3.5. Lipases.....	14
3.5.1. Produção de lipases.....	16
3.5.1.1. Influência da temperatura.....	17
3.5.1.2. Influência do pH.....	18
3.5.1.3. Influência da aeração.....	18
3.6. Fermentação no Estado Sólido.....	18
3.7. Planejamento experimental fatorial fracionado (PEFF).....	22
3.8. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	23
3.8.1. Coeficiente de variação.....	25
3.8.2. Intervalo de confiança.....	26
4. ANÁLISE MERCADOLÓGICA.....	27
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1. Microrganismo e meio de manutenção.....	40
5.2. Preparo das matérias-primas.....	40
5.3. Inoculação do meio fermentativo.....	40
5.4. Fermentação no estado sólido.....	42

5.5. Obtenção do extrato enzimático.....	43
5.6. Planejamento experimental fatorial fracionário (PEFF).....	43
5.7. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	43
5.8. Determinação da umidade.....	44
5.9. Determinação do pH.....	44
5.10. Quantificação da atividade lipolítica pelo método titulométrico.....	44
5.11. Quantificação da atividade proteolítica pelo método espectrofotométrico.....	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
6.1. Análise bromatológica.....	47
6.2. Perfil de pH.....	48
6.3. Perfil de umidade.....	50
6.4. Produção de lipases por <i>Y. lipolytica</i> por FES na ausência de suplementação.....	53
6.5. Produção de lipases por <i>Y. lipolytica</i> por FES utilizando suplementação com farelo de soja.....	55
6.6. Planejamento experimental fatorial fracionário (PEFF).....	59
6.7. Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	62
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

Devido às significativas alterações climáticas que o planeta vem sofrendo, cada vez mais as empresas vêm estudando e desenvolvendo processos de reutilização dos resíduos gerados em seus processos, com o intuito de reduzir a emissão de poluentes ao meio ambiente. Nesse contexto, a agroindústria, responsável por aproximadamente 6% do PIB brasileiro, apresenta grande potencialidade de otimização dos processos produtivos para gerar produtos com maior valor e reduzir os malefícios que causa ao ambiente.

A andiroba e o cupuaçu, frutos amazônicos de aplicação industrial, têm apresentado aumento de produção nos últimos anos devido às possibilidades de aproveitamento de suas polpas e da extração do óleo de suas sementes, que tem aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Além delas, a soja é um grão produzido e exportado em larga escala pelo Brasil por apresentar elevado valor nutricional e devido ao aproveitamento do seu óleo e outros derivados em setores como o cosmético, farmacêutico, veterinário e na produção de plásticos e combustíveis, como o biodiesel (SEDIYAMA, 2013).

O processamento desses frutos e grãos gera co-produtos, formados pela casca, bagaço e óleo residual, chamados de torta, que apresentam grande valor nutricional por serem ricos em fibras, proteínas e lípidios. A fim de reaproveitar esse material para a obtenção de um produto de maior valor agregado, o presente trabalho visou avaliar o potencial de sua utilização como matéria-prima para a produção de lipases por fermentação no estado sólido.

Lipases são esterases que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis, formando ácidos graxos livres, glicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol. Essas enzimas podem ainda realizar a reação reversa, catalisando a síntese de vários ésteres e a transesterificação, além das reações de aminólise, alcóolise, acidólise e lactonização. A utilização de lipases vem se intensificando nos últimos anos, devido à versatilidade dessas enzimas, como na indústria de alimentos, em que a lipase é utilizada para a hidrólise e modificação de gorduras, por transesterificação, e para produção de ácidos graxos, responsáveis pelo aroma e sabor em diversos alimentos, como queijos e iogurtes (PINHO et al., 2013). As lipases também têm aplicações promissoras na indústria de detergentes, na síntese de biosurfactantes, no setor farmacêutico e na produção de biodiesel (GORDILLO et al, 1998).

As lipases são enzimas produzidas por diferentes seres: animais, vegetais, bactérias e fungos. Dentre essas fontes produtoras de lipases, as microbianas são as de maior interesse industrial devido à grande variedade de microrganismos produtores. Adicionalmente, os

microrganismos destacam-se por não serem sujeitos a efeitos sazonais, por serem de fácil manipulação genética e por possuírem pequeno tempo de geração. (PINHO et al., 2013).

Dentre os microrganismos capazes de produzir lipases, destaca-se a levedura *Yarrowia lipolytica*, um microrganismo eucariótico e estritamente aeróbio, que, por possuir o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA), tem sido empregado em diversas aplicações industriais. Além disso, secreta outras enzimas, como proteases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (AMARAL, 2007).

Assim, buscou-se avaliar a viabilidade de utilização das tortas de andiroba e cupuaçu, adicionadas do farelo de soja como matéria prima para a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*, em fermentação no estado sólido, um processo vantajoso, pois esses materiais são mais baratos do que as fontes de carbono e nitrogênio usadas tradicionalmente. Além disso, em função da forma como o preparado enzimático for ser utilizado, pode reduzir posteriores etapas de purificação do produto e de tratamento de resíduos, de modo a rentabilizar o processo como um todo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar a produção de lipase pela levedura *Yarrowia lipolytica* por meio de fermentação em estado sólido, utilizando os co-produtos da agroindústria, farelo de soja e tortas de andiroba e de cupuaçu, como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento microbiano.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a utilização das tortas de andiroba e cupuaçu, adicionadas de farelo de soja como fonte única de nutrientes na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*;
- Avaliar a influência da umidade e do volume de inóculo, bem como o uso de suplementação externa na eficiência da fermentação;
- Avaliar o perfil de umidade ao longo de horas de fermentação;
- Avaliar o perfil de pH do processo fermentativo;
- Estabelecer os parâmetros mais relevantes e a composição ideal do meio de cultivo para atingir melhor produtividade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Amazônia

A Amazônia compreende um conjunto de ecossistemas que envolve a bacia hidrográfica do Rio Amazonas, bem como a Floresta Amazônica. É considerada a região de maior biodiversidade do planeta e o maior bioma do Brasil.

O bioma Amazônia não é exclusivo do território brasileiro, abrangendo áreas de outros oito países: Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. Considerando a sua abrangência nos nove países, a Amazônia ocupa uma área de aproximadamente 6,9 milhões de quilômetros quadrados. A parcela situada no Brasil tem área de aproximadamente 4,2 milhões de quilômetros quadrados, o que corresponde a cerca de 49% do território nacional. (CAMPOS, 2009).



Figura 1: Mapa da distribuição da Floresta Amazônica na América do Sul

Fonte: World Atlas. Dorling Kindersley, 2003

O clima predominante na Amazônia é o equatorial úmido. Trata-se de uma região caracterizada por longos períodos de chuvas, com índices pluviométricos que variam entre 1.500 mm e 3.600 mm por ano. A umidade do ar é elevada, chegando a 80%, e as temperaturas variam entre 22°C e 28°C (CAMPOS, 2009).

A Amazônia abriga a Floresta Amazônica, considerada a maior floresta tropical do mundo, que abrange uma área de mais de 5 milhões de km². A floresta conta com um elevado número de espécies vegetais, com mais de 2.500 espécies de árvores e 30 mil espécies de plantas, e, de maneira geral, é caracterizada por uma floresta densa e pela presença de árvores de grande porte.

As estimativas situam a região como a maior reserva de madeira tropical do mundo. Seus recursos naturais – que, além da madeira, incluem enormes estoques de borracha, castanha, peixe e minérios, por exemplo – representam uma abundante fonte de riqueza natural. Segundo um levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a região atingiu em 2017 a participação de 8% do total do PIB brasileiro, um avanço em relação aos 5,8% registrados 20 anos antes.

Com a economia baseada principalmente no setor agroindustrial, a maioria dos estados que compõem a Amazônia realizam atividades como a agricultura, pecuária, extrativismo e processamento e beneficiamento da madeira e de produtos oriundos da agricultura familiar, geralmente de culturas perenes como frutas, café, borracha, cacau e outros.

3.2. Frutos amazônicos

O Brasil apresenta um expressivo número de frutas nativas, que o colocam em segundo lugar como grande centro de origem de espécies frutíferas tropicais, vindo logo após do sudeste asiático, sendo que poucas delas, até então, atingiram participação expressiva no agronegócio de frutas. Com exceção do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), o cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e, secundariamente, o maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims.), que há bastante tempo são cultivados em larga escala, em particular na América Tropical, África e Ásia, as demais ainda não se projetaram na “era das novas culturas”, tendo algumas delas importância somente em nível regional (DUCKE, 1946).

A diversidade de frutas do Brasil está representada por aproximadamente 500 espécies, sendo o principal centro de diversificação a Amazônia Brasileira, onde são encontradas cerca de 220 plantas produtoras de frutos comestíveis. (DUCKE, 1946).

Muito antes dos primeiros colonizadores adentrarem as terras brasileiras algumas frutas amazônicas eram mais importantes do que são atualmente. Nessa situação particular encontram-se o abiu (*Pouteria caimito*), o biribá (*Rollinia mucosa*), o cubiu (*Solano sessiliflorum*), a pupunha (*Bactris gasipaes*), o umari amarelo (*Poraqueiba paraensis*), e o

umari preto (*Poraqueiba sericea*). Atesta-se a importância dessas frutas em passado remoto pelo fato de serem culturas pré-colombianas e de algumas populações se encontrarem completamente domesticadas, quando os primeiros colonizadores europeus chegaram ao Brasil, no século 16 (DUCKE, 1946).

A forte pressão de mercado exercida pelas frutas exóticas, aquelas produzidas e comercializadas regionalmente, que dispõem de excelentes sistemas de produção e de tecnologias de pós-colheita avançadas, que garantem presença diária nas gôndolas dos supermercados, em quitandas e feiras livres, constitui-se no primeiro fator favorável para a disseminação cada vez mais acentuada dessas frutas no mercado amazônico. Além disso, são comercializadas com preços bastante competitivos, sem oscilações acentuadas durante o ano, ao contrário de outras frutas, cujos preços são normalmente mais elevados e com variações de grande magnitude durante o ano (NEVES, 2004).

Das frutas amazônicas que ganharam espaço no mercado, destacam-se o açaí, maracujá, urucum, cupuaçu, cacau e andiroba. Com o progresso da agronomia e da engenharia genética, diferentes cultivares vem sendo obtidos de modo a apresentar maior resistência a doenças, maior produtividade, melhor adaptação ao ambiente e maior qualidade final do produto (BARTH, 2005).

Além de serem comercializadas *in natura*, muitas dessas frutas são processadas e beneficiadas, de modo a gerar produtos com maior valor agregado. Como exemplo, podemos citar a produção de corantes, óleos e extratos da polpa, que são destinados majoritariamente para as indústrias alimentícia e de cosméticos (NEVES, 2004).

A extração desses componentes de interesse gera co-produtos formados pelo bagaço, casca e sementes dos frutos, que são, muitas vezes, descartados na natureza de forma incorreta. Nesse contexto, surge a necessidade do reaproveitamento e tratamento desses materiais, ainda muito ricos em nutrientes como proteínas, carboidratos, lipídios e fibras (NEVES, 2004).

3.2.1. Cupuaçu

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum*, pertence à família *Sterculiaceae*, gênero *Theobroma*. Esta espécie é encontrada espontaneamente nas áreas de mata do sul e nordeste da Amazônia oriental brasileira e nordeste do Maranhão, e também na região Amazônica de países vizinhos. (SOCHA, 2015).

Quando cultivada, a planta atinge de 6 a 10 metros de altura, e 15 a 20 metros nos indivíduos encontrados desenvolvendo-se espontaneamente na mata, principalmente em

áreas de castanhais. É uma espécie que apresenta tricotomia, ou seja, cada ramo se divide em três partes e assim sucessivamente. Em muitos casos pode brotar de uma das ramificações uma gema que irá originar uma haste semelhante à haste principal. As folhas são inteiras, e quando jovens, a coloração é rósea e abundantemente coberta de pelos, que soltam-se facilmente ao contato da mão, quando atingem seu desenvolvimento completo. (SOCHA, 2015).



Figura 2: Cupuaçuzeiro e corte ortogonal do cupuaçu

Fonte: Embrapa

Suas flores são as maiores do gênero e crescem nos ramos, sendo pediculares de 3 a 5 centímetros, de coloração vermelho-escuro. O fruto é uma baga drupácea, elipsóide, com as extremidades obtusas ou arredondadas, variando de 15 a 35 cm de comprimento por 10 a 15 cm de diâmetro e peso médio de 1.500 g. Possui o epicarpo (casca) duro, lenhoso, porém facilmente quebrável, recoberto de pelos ferrugíneos; raspando-se de leve, aparece uma camada clorofilada verde, isto para o fruto maduro, o qual se desprende no ponto de união deste com o pedúnculo. A polpa comestível (endocarpo) de coloração amarela ou brancacenta, abundante, de sabor ácido e cheiro forte, envolve as sementes cujo número é bastante variável. (NAZARÉ, 1990).

A polpa do fruto do cupuaçu possui uma acidez peculiar que a torna muito apreciada e consumida sob forma de compotas, sucos, sorvetes e licores. Suas sementes possuem uma gordura semelhante à manteiga do cacau: isenta de cheiro, cor e gosto que, quando extraída, é muito utilizada para a preparação de chocolate. A torta, mistura formada pela casca e pelo bagaço, obtida após a extração da polpa e do óleo das sementes é comumente usada para a produção de ração animal e adubos orgânicos, por ser rica em aminoácidos e óleos. (NAZARÉ, 1990).

Tabela 1: Análise bromatológica do fruto íntegro do cupuaçu

Fonte: CALZAVARA, 1984

Acidez (%)	2,15
Brix	10,80
pH	3,30
Aminoácidos (mg % N)	21,90
Vitamina C (mg %)	23,12
Pectina	0,39
Polpa (%) 3.000 rpm/10 min	80,00
Resíduo mineral fixo (%)	0,67
Fósforo (% P205)	0,31
Cálcio (% CaO)	0,04
Extrato etéreo (%)	0,53
Sólidos totais (%)	11,00
Voláteis (%)	89,00
Açúcares redutores (%)	9,09

NAZARÉ (1990) estima que a polpa corresponda a 35% da massa total da fruta. Os 65% restantes são compostos de 45% de casca e 20% de sementes. Da massa das sementes, aproximadamente 48% é formada pela gordura comestível (CALZAVARA, 1984). Assim, estima-se que a produção de cupuaçu dos três principais estados produtores (Amazonas, Rondônia e Acre) seja de 15.500 toneladas por ano, o que, após a extração da polpa e do óleo das sementes, resulta numa geração de 8.590 toneladas de torta por ano (CALZAVARA, 1948).

3.2.2. Andiroba

Apesar de serem encontradas também em terra firme, SAMPAIO (2000) ressalta que as andirobeiras, árvores de onde se extrai a andiroba, ocorrem em toda bacia Amazônica, principalmente nas várzeas próximas ao leito de rios e faixas alagáveis ao longo dos cursos de água. São árvores de grande porte, chegando a atingir 30 m de altura, com tronco cilíndrico, reto e sapopemas em sua base.

Sua madeira é moderadamente pesada, de cor avermelhada e resistente ao ataque de cupins. É empregada na fabricação de móveis, construção civil e na indústria naval (NEVES et al., 2004). São encontrados nectários extraflorais e suas flores perfumadas são visitadas

por abelhas. Os frutos das árvores desse gênero são cápsulas globosas, amarronzadas, com quatro a seis valvas, que liberam as sementes após a abertura do fruto durante seu impacto no chão. Além da casca e da polpa, o fruto possui sementes, que são utilizadas para produzir um óleo utilizado como cosmético e fitoterápico. Tal óleo, também conhecido como “azeite de andiroba”, é extraído mecanicamente e usado principalmente como cicatrizante e anti-inflamatório. Na indústria farmacêutica homeopática é comercializado na forma de cápsulas e indicado para o tratamento de diabetes e reumatismo. Pode ser usado também como matéria-prima para fabricação de repelentes contra insetos (NEVES et al., 2004).



Figura 3: Adirobeira e fruto andiroba

Fonte: Armazém Amazônico ABC

O período de safra principal ocorre nos meses de janeiro e fevereiro, que concentra 70% da produção de sementes, porém a produção de julho a agosto é considerada como a de melhor qualidade e rendimento de óleo (MENEZES, 2005). O isolamento geográfico das comunidades faz com que a divisão técnica e social do trabalho seja, no geral, reduzida a uma família que domina todo o processo até o produto final. Devido a isso, existem poucos registros da quantidade de óleo de andiroba produzido no Brasil, mas sabe-se que 40% da massa de cada fruto corresponde às sementes que, por sua vez, contêm 43% de gordura e para obter um litro de óleo de forma artesanal serão necessários 12 quilogramas de sementes *in natura*. Assim, estima-se que para cada litro de óleo de andiroba produzido, são gerados aproximadamente 30 quilogramas de torta, formada pelo bagaço, casca e polpa, que habitualmente é considerada um resíduo e é descartada na natureza (SAMPAIO, 2000).

3.3. Soja

A soja cultivada é uma planta herbácea incluída na classe Magnoliopsida (Dicotiledônea), ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine* L.

É uma planta com grande variabilidade genética, tanto no ciclo vegetativo (período compreendido da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores), como no reprodutivo (período do início da floração até o fim do ciclo da cultura), sendo também influenciada pelo meio ambiente. O caule é ramoso, hispido, com tamanho que varia entre 80 e 150 cm e suas folhas se classificam em quatro tipos: cotiledonares, folhas primárias ou simples, folhas trifolioladas ou compostas e prófilos simples.

A soja é essencialmente uma espécie autógama, ou seja, uma planta polinizada por ela mesma e não por outras plantas. Insetos, principalmente abelhas, podem transportar o pólen e realizar a polinização de flores de diferentes plantas, mas a taxa de fecundação cruzada, em geral, é menor que 1%. As sementes de soja são lisas, ovais, globosas ou elípticas e se desenvolvem dentro de vagens. Podem também ser encontradas nas cores amarela, preta ou verde. O hilo é geralmente marrom, preto ou cinza. (FARIAS, 2007).



Figura 4: Vagem de soja na fase madura

Fonte: Notícias Agrícolas (acesso em 01/10/2019)

A soja se adapta melhor à regiões onde as temperaturas oscilam entre 20 °C e 30°C, sendo que a temperatura ideal para seu desenvolvimento está em torno dos 30°C, pois a germinação e emergência da planta são favorecidas. Regiões com temperaturas inferiores a 10°C não são recomendadas para o cultivo pois o crescimento vegetativo da soja é pequeno ou nulo. Por outro lado, em temperaturas acima de 40°C, a taxa de crescimento, a floração e a retenção de vagens ficam comprometidos. Além disso, o cultivo de soja é muito sensível a disponibilidade hídrica e fotoperiódica, pois o estresse hídrico e a incidência excessiva de luz solar atrasam ou inviabilizam o período de florescimento da planta. Assim, no Brasil, os estados que se destacam na produção da soja são o Mato Grosso, o Paraná e o Rio Grande do Sul (FARIAS, 2007).

A soja é uma importante fonte de divisas para o Brasil, contribuindo com uma parcela significativa das exportações brasileiras, tanto que lidera o ranking de produtos mais exportados há mais de 22 anos e, na safra 2018/2019, a cultura totalizou uma produção de 114,84 milhões de toneladas, segunda a Embrapa. Além disso, inúmeras famílias das mais diversas classes econômicas dependem direta ou indiretamente dos empregos gerados pelo complexo de produção, transporte e industrialização da soja.

Além de serem vendidos *in natura*, os grãos de soja podem seguir para a indústria de esmagamento, refino e produção de derivados. Tal indústria extrai, refina e processa derivados do óleo e seus principais produtos são o óleo bruto e o óleo refinado. Este segmento proporciona as maiores potencialidades de competitividade da cadeia produtiva, pelas possibilidades de diferenciação e da consequente agregação de valor. (SEDIYAMA, 2013).

O óleo de soja tem diferentes aplicações nas indústrias cosmética, farmacêutica, alimentícia, veterinária (produção de ração animal) e na produção de vernizes, tintas, plásticos, lubrificantes e combustíveis, como o biodiesel (GERIS, 2007).

Tabela 2: Composição do óleo de soja

Fonte: SEDIYAMA, 2013

Ácidos graxos livres (% em ácido oléico)	0,09
Índice de peróxidos (meq/kg)	3,21
Índice de refração (40 °C)	1,4671
Compostos polares totais (%)	5,09
Composição em ácidos graxos (%)	
Ácido Palmítico (C16:0)	12,66
Ácido Esteárico (C18:0)	3,96
Ácido Oléico (C18:1n9)	23,61
Ácido Linoléico (C18:2n6)	55,26
Ácido Linolênico (C18:3n3)	4,52

No Brasil, cerca de 80 % da produção de biodiesel é feita com óleo de soja. O processo reacional é a transesterificação dos ácidos graxos presentes no óleo utilizando álcoois de baixa massa molecular (como, por exemplo, metanol, etanol, propanol), conforme as reações da Figura 5. Devido a sua composição, o biodiesel de soja brasileira apresenta uma baixa estabilidade oxidativa, sendo relatado o seu escurecimento, acidificação e

formação de borras, que são geralmente mitigados pelo processo de oxidação parcial a baixas temperaturas. (GERIS, 2007).

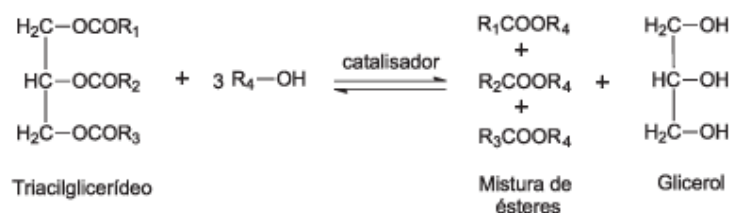


Figura 5: Reação genérica de transesterificação

Fonte: GERIS, 2007

A extração do óleo da soja gera como co-produto um farelo, assim como no caso do cupuaçu e da andiroba, formado pela casca e pelo bagaço do grão. Por possuir elevado valor nutricional, esse material vem sendo estudado e usado como complemento alimentar para ruminantes e aves. A Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (Abiove) estima que a produção de farelo de soja em 2019 tenha sido de 33 milhões de toneladas, dos quais 16 milhões de toneladas foram exportados.

O presente trabalho teve como motivação, portanto, avaliar a viabilidade tecnológica da utilização das tortas de andiroba e cupuaçu, bem como do farelo de soja, na produção de lipases, enzimas de elevado valor agregado. Tais matérias-primas, apesar de serem habitualmente consideradas co-produtos na agroindústria, apresentam elevados teores de aminoácidos, lipídios e carboidratos, podendo, assim, fornecer esses nutrientes e funcionar também como matriz de suporte para *Yarrowia lipolytica*, microrganismo utilizado para conduzir a fermentação no estado sólido desses materiais.

3.4. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo pertencente ao reino Fungi, classe dos Ascomycetos e subclasse Hemiascomycetos, estritamente aeróbio e eucariótico. Em relação à biologia molecular, fisiologia e genética, *Yarrowia lipolytica* é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados, como *Saccharomyces cerevisiae* (considerada levedura “convencional”) e, portanto, pertence ao grupo das leveduras “não-convencionais”, sendo a espécie mais estudada dentre elas (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Como não é considerada patogênica, já foi utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas heterólogas, flavour de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela *American Food and Drug Administration* como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (TSUGAWA et al., 1969). Além disso, secreta várias enzimas, como

proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de interesse biotecnológico (NICAUD et al., 2002).

Existe ainda um campo que vem sendo explorado com as leveduras não convencionais para aplicações biomédicas, que é a produção de proteínas heterólogas. Historicamente, *Saccharomyces cerevisiae* foi usada como hospedeiro para produção de proteínas heterólogas, mas apresentou baixa produtividade, pobre estabilidade de plasmídeo e baixa capacidade de secreção (MADZAK et al., 2004). MULLER e colaboradores (1998) testaram quatro leveduras não convencionais e *S. cerevisiae* na produção de seis enzimas fúngicas e todas as não convencionais foram mais eficientes que a levedura convencional, sendo *Y. lipolytica* o hospedeiro que apresentou melhor performance e reprodutibilidade.

Na maioria das leveduras “não-convencionais”, como *Y. lipolytica*, a respiração em presença de oxigênio é essencial para o uso de açúcares e, sendo um microrganismo aeróbio restrito, *Y. lipolytica* não tem sua taxa de respiração, seu conteúdo de citocromos ou propriedades mitocondriais afetados por altas concentrações de glicose (FLORES et al., 2000). O conhecimento da regulação do metabolismo de glicogênio é de grande importância para monitorar e controlar as condições de cultura de leveduras utilizadas em biotecnologia. A gama de substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares. O efeito da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento de uma cepa de *Yarrowia lipolytica*, em meio de cultivo contendo glicose, foi reportado por KAMZOLOVA et al. (2003), que ao aumentar a saturação de oxigênio dissolvido por meio do aumento de pressão do bioreator de 5% para 60%, observou o aumento de 2,8 para 6,9 g.L⁻¹ na concentração celular. O aumento da concentração de oxigênio não provocou esse efeito apenas no crescimento celular, mas também na produção de um metabólito, o ácido cítrico, que aumentou de 0 para 18,2 g/L no mesmo experimento.

Yarrowia lipolytica é um fungo que apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de leveduras, pseudo-hifas e hifas septadas (BARTH e GAILLARDIN, 1997). Esse fenômeno atrai muita atenção devido à possibilidade de sua ligação à virulência de vários fungos patogênicos importantes, incluindo *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans*. A caracterização das condições que regulam a morfogênese e diferenciação das células pode levar a importantes descobertas de novos remédios ou tratamentos efetivos contra leveduras patogênicas. Em contraste com *S. cerevisiae*, SZABO (1999) apresentou resultados mostrando que a formação de hifas em culturas de *Yarrowia lipolytica* foi inibida pela limitação de nitrogênio, enquanto que a fonte de carbono, aparentemente não foi importante para a formação de filamentos. Foi observado que o pH do meio afeta fortemente a morfologia de células de *Yarrowia lipolytica*, mas apenas na

presença de uma fonte de nitrogênio complexa, sugerindo que as células respondem mais a alterações nutritivas do meio com diferentes valores de pH do que ao próprio valor de pH. Num estudo posterior, SZABO e ŠTOFANÍKOVÁ (2002) comprovaram a importância da presença de fontes de nitrogênio orgânico no efeito do pH na morfologia celular de *Y. lipolytica*. KAWASSE e colaboradores (2003) estudaram a aplicação de estresse térmico e oxidativo em um cultivo de células de *Yarrowia lipolytica*. Através de processamento digital de imagens foi comprovado que ambas condições de estresse fizeram com que as células de leveduras apresentassem um maior crescimento na forma de hifas.

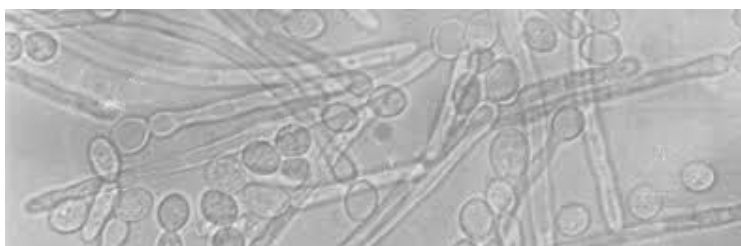


Figura 6: Microscopia ótica de cepa de *Yarrowia lipolytica*

Fonte: DUTRA, 2010

3.5. Lipases

Lipases (triacilglicerol esteracilhidrolases E.C.3.1.1.3.) são esterases que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis de cadeias longas de ácidos graxos, formando ácidos graxos livres, glicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol. Essas enzimas podem ainda realizar a reação reversa, quando submetidas a meios reacionais não-aquosos ou micro-aquosos, catalisando a síntese de vários ésteres. Essas enzimas atuam na interface água-óleo catalisando, preferencialmente, a hidrólise de ésteres de ácidos graxos insolúveis em água, o que as diferencia de outras esterases que agem sobre ésteres solúveis (WHITAKER, 1972).

Os ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis apresentam números de átomos de carbono variando de 3 a 22 e, além disso, podem, em alguns casos, apresentar insaturações. Existe, assim, uma outra característica que é empregada para diferenciar as lipases das demais esterases que é o fato de as lipases hidrolisarem triacilgliceróis com cadeia graxa maior ou igual a 10 carbonos, enquanto que as esterases teriam como substrato apenas triacilgliceróis contendo menos de 10 carbonos na cadeia graxa (JAEGER et al., 1999).

A diversidade de ácidos graxos presentes na natureza é muito grande, assim como a proporção desses diferentes ácidos nas gorduras, o que propiciou a existência de vários tipos de lipases. Dependendo da origem ou da forma de obtenção, é possível obter lipases com características bastante distintas.

GUERZONI et al. (2001) investigaram a liberação de ácidos graxos devido a atuação das lipases de doze diferentes cepas de *Y. lipolytica* inoculadas em manteiga. O ácido oléico (C18:1) foi o principal ácido graxo liberado no meio pela maioria das cepas. No entanto, algumas cepas liberaram maior percentual de ácido linolênico (C18:2), esteárico (C18:0), margárico (C17:0) ou heptadecanóico (C17:1). A variabilidade observada nesse grupo de cepas em relação aos ácidos graxos liberados demonstra a diversidade do padrão lipolítico das diferentes cepas de uma mesma espécie. Além disso, os autores também enfatizaram a influência das condições ambientais na expressão das lipases de uma mesma cepa, ou seja, combinações específicas de fatores geraram grandes diferenças nos ácidos graxos liberados pela ação de uma mesma cepa.

As lipases microbianas são glicoproteínas de peso molecular variando entre 19 e 60 kDa (JAEGER e REETZ, 1998), apresentando em torno de 258 e 544 resíduos de aminoácidos, dos quais um grande número são hidrofóbicos e responsáveis pela interação entre a enzima e substratos insolúveis em água.

As lipases exibem um padrão de dobramento característico, conhecido como dobra hidrolase α/β . O centro da lipase é composto por uma folha β central com até oito lâminas β ($\beta 1 - \beta 8$) conectadas por até seis α hélices (A – F) e o sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica. As estruturas tridimensionais (3D) das lipases do fungo *Rhizomucor miehei* e do pâncreas humano foram determinadas em 1990 (WINKLER et al., 1990), o que levou a um melhor entendimento do mecanismo de catálise na interface substrato-fase aquosa. Descobriu-se que o sítio ativo de algumas lipases é protegido estericamente por uma espécie de tampa, formada por resíduos hidrofóbicos, que são deslocados ao entrar em contato com o substrato, expondo o sítio ativo. Quando essas lipases são submetidas a meios aquosos, o deslocamento dessa estrutura torna-se termodinamicamente desfavorável. O movimento da estrutura que compõe a tampa confere às lipases pelo menos duas conformações distintas, sendo a primeira denominada “fechada” ou inativa pelo não deslocamento da tampa e a segunda denominada “aberta” ou ativa, pelo deslocamento da tampa na presença de substratos hidrofóbicos. Existem lipases que não apresentam essa tampa, como por exemplo, a lipase de *Bacillus subtilis* (POUDEROYEN et al., 2001). Os autores determinaram a estrutura de raios-X dessa lipase e não foi encontrada nenhuma tampa.

3.5.1. Produção de lipases

As lipases podem ser encontradas em animais (pâncreas, plasma de sangue, saliva, suco pancreático), no leite, em vegetais (soja, amendoim, etc.), bactérias e fungos (WHITAKER, 1972). Nos eucariotas, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo lipídico, incluindo a digestão de gorduras, o metabolismo de lipoproteínas, absorção e reconstituição. Nas plantas, as lipases são encontradas nos tecidos de reserva de gordura (SHARMA et al., 2001). Entre as fontes produtoras de lipases, as microbianas são as de maior interesse industrial por vários motivos, entre eles, a grande variedade de microrganismos produtores. Existem inclusive algumas lipases de origem microbiana que já são disponíveis comercialmente, como a lipase de *Candida rugosa* (JAEGER e REETZ, 1998).

Adicionalmente, os microrganismos destacam-se por não serem sujeitos a efeitos sazonais, por possuírem pequeno tempo de geração, por serem de fácil manipulação genética e ainda por produzirem, na maioria dos casos, lipases extracelulares, de fácil obtenção (PEREIRA-MEIRELLES, 1997). Os microrganismos produtores de lipases têm sido encontrados em diversos habitats, como em resíduos industriais em fábricas que processam óleos vegetais, em indústrias de laticínios, em solos contaminados com óleo, em sementes que produzem óleo, em pilhas de compostagem, em alimentos em deterioração, entre outros (SHARMA e colaboradores, 2001).

Entre os microrganismos produtores estão as bactérias (JAEGER et al., 1999), os fungos filamentosos (ELIBOL e OZER, 2002), as leveduras (MURALIDHAR e colaboradores, 2001) e os actinomicetos (SZTAJER et al., 1988). As leveduras apresentam uma série de vantagens frente às outras fontes microbianas, como, por exemplo, menor tempo de geração do que os fungos filamentosos e melhor adaptação a longos tempos de processo. Além disso, são geneticamente mais estáveis do que as bactérias e, assim como algumas bactérias e fungos, possuem *status* GRAS (*Generally Regarded As Safe*), o que permite que os produtos obtidos por estes microrganismos sejam mais aceitos nos setores alimentício e farmacêutico (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

A utilização de lipases vem se intensificando nos últimos anos, devido à versatilidade dessas enzimas. Esta característica vem do fato de que as lipases são capazes de catalisar inúmeras reações, gerando assim uma ampla gama de aplicações em diversos setores industriais. Na indústria de alimentos, por exemplo, a lipase é utilizada principalmente para a produção de ácidos graxos, responsáveis pelo desenvolvimento do aroma e sabor, principalmente em queijos (AKIN et al., 2003), e na modificação de lipídeos, aumentando seu valor comercial e nutritivo (OSÓRIO et al., 2001).

As lipases também têm aplicações promissoras na indústria de detergentes, removendo resíduos gordurosos ou até mesmo na síntese de biosurfactantes, substituindo parcial ou totalmente os surfactantes, que causam danos ao meio ambiente (HEMACHANDER e PUVANAKRISHNAN, 2000). Uma das aplicações mais antigas das lipases é na indústria farmacêutica, que foi um dos setores que mais beneficiou o avanço dos estudos da utilização de lipases. A capacidade dessa enzima de catalisar reações de síntese ou hidrólise de ésteres, gerando produtos em excesso enantiomérico, pode ser útil na síntese de compostos opticamente ativos de interesse farmacêutico (OKAZAKI et al., 1997), (MANOEL, 2012).

Uma promissora aplicação das lipases reside na produção de biodiesel. O biodiesel (ésteres metílicos de ácidos graxos) é um combustível biodegradável, não-tóxico, produzido a partir de fontes renováveis e, portanto, tem se tornado cada vez mais importante devido à redução das reservas de petróleo e a poluição causada por combustíveis fósseis (MARCHETTI et al., 2007). A utilização de lipase como catalisador para a produção de biodiesel é vantajosa, principalmente, do ponto de vista ambiental e em relação às condições operacionais em comparação com os catalisadores químicos (ácidos e básicos). No entanto, o alto custo das lipases e os efeitos negativos para a enzima dos reagentes (metanol) e produtos (glicerol) da reação de transesterificação ainda mantêm essa tecnologia desvantajosa economicamente (MARCHETTI et al., 2007). Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para contornar tais empecilhos (LI et al., 2006). Esta enzima também encontra aplicações em vários outros setores industriais, como cosméticos e oleoquímica (SHARMA et al., 2001). Até mesmo no tratamento de efluentes a atividade lipolítica tem sido aplicada com sucesso (SCIOLI e VOLLARO, 1997).

3.5.1.1. Influência da temperatura

Tanto o crescimento microbiano quanto às reações enzimáticas em si são fenômenos dependentes da temperatura. Em geral, o crescimento de um microrganismo mesofílico se dá na faixa de 25 a 30° C e a produção de lipases ocorre na faixa de 27 a 30°C (PEREIRA-MEIRELLES, 1997). CORZO e REVAH (1999) detectaram que a temperatura foi o fator que mais influenciou a produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* entre os demais fatores estudados (pH e tempo de incubação). Através de uma análise estatística, encontraram a temperatura de 29,5°C como sendo a melhor temperatura para a produção de lipase desta cepa.

3.5.1.2. Influência do pH

A produção de lipases também é bastante sensível a mudanças no pH. Na maioria dos casos, o pH adequado à produção de lipases por células de leveduras deve ser mantido próximo à neutralidade ou ligeiramente ácido (5,5 a 7,0) (PEREIRA-MEIRELLES, 1997). Parece haver relação direta entre a temperatura e o pH ótimos para o crescimento microbiano e a formação de produtos. CORZO e REVAH (1999) obtiveram resultados que evidenciam este fato, pois a análise estatística mostrou que a interação entre os fatores pH e temperatura foram mais importantes na produção de lipases do que o fator pH por si só. Nesta mesma análise, os autores obtiveram o pH ótimo de produção de lipase para *Yarrowia lipolytica* igual a 4,7.

3.5.1.3. Influência da aeração

Condições aeróbias são preferenciais para a produção de lipases, principalmente se o microrganismo produtor for estritamente aeróbio, como a levedura *Y. lipolytica*, pois nesse caso, o oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons, reoxidando moléculas na cadeia respiratória. A produção de diversas substâncias em escala laboratorial é realizada tradicionalmente em erlenmeyers incubados em banhos agitados. Portanto, nesses casos, para se estudar a influência da concentração de oxigênio na produção de lipases é comum variar o volume de meio de cultura em frascos com volume constante. Desta forma, quanto maior o volume de meio, menor é a disponibilidade de oxigênio, pois se reduz à superfície de contato com o ar (KAMZOLOVA, 2003).

CORZO e REVAH (1999) realizaram experimentos em erlenmeyers de 250 mL com volumes de meio de cultura de 30, 50 e 100 mL. A produção de lipases foi melhor em maiores volumes de meio de cultura. PEREIRA-MEIRELLES (1997) demonstrou que a razão Volume de meio/Volume do frasco ($V_{\text{meio}}/V_{\text{frasco}}$) altera sensivelmente o nível de atividade, o que mostra haver uma concentração de oxigênio dissolvido crítica, abaixo/acima da qual os níveis de atividade enzimática são muito inferiores.

3.6. Fermentação no Estado Sólido

A literatura reporta dois tipos de sistemas de produção de lipases: fermentação em meio sólido e fermentação submersa. A fermentação submersa é a mais utilizada para produção de lipase e é realizada em frascos agitados (PEREIRA-MEIRELLES, 1997), em fermentadores de bancada (AMARAL, 2007) ou em fermentadores em escala industrial. De uma forma geral, a fermentação submersa é conduzida de forma descontínua, mas a

produtividade pode ser aumentada, em alguns casos, pela condução por batelada alimentada ou de forma contínua (GORDILLO et al., 1998).

A fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semi-sólida ou fermentação em meio semi-sólido define-se como o processo fermentativo no qual o desenvolvimento de microrganismos se dá sobre ou dentro de partículas sólidas, na ausência ou quase ausência de água livre. Nesse processo, a matriz sólida pode ser a fonte de nutrientes ou apenas um suporte impregnado pelos nutrientes necessários para o desenvolvimento dos microrganismos e a água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas. Para obter fermentações com altos rendimentos, deve-se levar em consideração a fisiologia dos microrganismos e fatores físico-químicos do processo, como temperatura, pH, aeração, atividade de água, umidade e natureza do substrato sólido.

Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos (AIDOO et al., 1982). Contudo, são os fungos filamentosos os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (DURAND, 2003). Esse fato se traduz na grande quantidade de aplicações e produtos obtidos pelo emprego desses microrganismos, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3: Produtos que podem ser obtidos por fermentação no estado sólido a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos

Fonte: PINTO, 2005

Produto/Processo	Microrganismos Mais Utilizados	Matéria-prima
Pectinases	<i>Lentinus edodes</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de frutas Farelo de trigo Polpa de café
Hemicelulases	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Aspergillus tamaritii</i>	Farelo de trigo Farelo de trigo, sabugo de milho, bagaço de cana
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo Resíduos de chá
Proteases	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo
Lipases	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu
Fitase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo, farinha de soja
Tanase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
Ácido Cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de maçã, abacaxi, goiaba, bagaço de cana
Ácido Giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Farelo de trigo
Pigmentos	<i>Monascus purpureus</i>	Arroz
Carotenóides	<i>Penicillium sp.</i>	Sabugo de milho
Enriquecimento Proteico	<i>Penicillium decumbens</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>	Palha de milho Farinha de colza
Biorremediação	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Materiais lignocelulósicos
Biopolpação	<i>Pleurotus sp.</i>	Farelo de trigo

Essa técnica tem se mostrado vantajosa pois apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor suscetibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH (SINGHANIA et al., 2010). Do ponto de vista econômico, a FES é interessante na medida em que reduz posteriores etapas de concentração dos produtos,

geram menos resíduos e tem a possibilidade de aproveitar materiais provenientes da agroindústria, principalmente em países com abundância de biomassa. No entanto, apresenta dificuldades como o difícil controle e monitoramento do processo e a baixa oxigenação. Resíduos da extração de óleo de oliva e bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados por CORDOVA et al. (1998) no cultivo de *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis* e obtiveram melhor atividade lipolítica com o bagaço de cana-de-açúcar e com a mistura dos dois sólidos. *Penicillium restrictum* foi utilizado para produção de lipase em resíduo sólido da indústria de óleo de babaçu, obtendo atividade máxima em 24 h de cultivo quando o mesmo foi suplementado com 2% de óleo de oliva (GOMBERT et al., 1999).

A aeração dos biorreatores da FES é considerada um fator crítico na produtividade do processo, pois o ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas. O substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais para que o ar, além de prover O₂ aos microrganismos, também retire o CO₂ e outros elementos voláteis expelidos durante a fermentação. A taxa de aeração também pode ser aplicada de maneira integrada ao controle da umidade relativa e da temperatura do ar passante durante a fermentação (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al, 1992).

Um resumo dos principais trabalhos sobre produção de lipases utilizando a FES, sendo a matriz sólida composta por diversos resíduos agroindustriais, é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Descrição de substratos naturais e microrganismos envolvidos na fermentação no estado sólido para a produção de lipases

Matéria-prima	Atividade lipolítica (U/g)	Método de dosagem	Microrganismo	Referência
Farelo de soja	19,2	Titulométrico (óleo oliva)	<i>Penicillium sp</i>	GRIEBELER et al. (2009)
Farelo de soja	40,0	Titulométrico (óleo oliva)	<i>P. verrucosum</i>	KEMPKA et al. (2008)
Farelo de soja	30,0	Titulométrico (óleo oliva)	<i>P. simplicissimum</i>	VARGAS et al. (2008)
Torta de babaçu	30,0	Titulométrico (óleo oliva)	<i>P. simplicissimum</i>	GUTARRA et al. (2007)
Torta de soja	21,0	Titulométrico (óleo oliva)	<i>P. simplicissimum</i>	DI LUCCIO et al. (2004)
Farelo de trigo	630,0	Espectrofométrico (pNPP)	<i>A. niger</i> NCIM1207	MAHADIK et al. (2002)
Torta de oliva	79,6	Colorimétrico (piridina)	<i>R. rhizopodiformis</i>	CORDOVA et al. (1998)
Torta amêndoas	48,0	Titulométrico	<i>R. oligosporus</i>	UL-HAQ et al. (2002)
Bagaço de cana	1500,0	Titulométrico (trioleína)	<i>R. homothallicus</i>	DIAZ et al. (2006)
Farelo de trigo	69,0	Titulométrico (tributirina)	<i>Y. lipolytica</i>	DOMINGUEZ et al. (2003)
Torta de algodão Farelo de soja	102,0 139,0	Espectrofométrico (pNPL)	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	FARIAS et al. (2014)
Resíduos da indústria de óleo de oliva e farelo de trigo	486,0	Espectrofométrico (pNPL)	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	LOPES et al. (2016)
Farelo de soja Torta de canola	93,9 72,6	Titulométrico (óleo oliva)	<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50682	SOUZA et al. (2017)

3.7. Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (PEFF)

O planejamento experimental fatorial é um procedimento experimental e de análise de observações usado quando deseja-se avaliar a influência de dois ou mais fatores, que são as variáveis independentes passíveis de serem controladas em um mesmo experimento. Por meio dele, é possível estimar efeitos principais de cada um dos fatores e também das interações de diferentes ordens entre eles. A dificuldade desse tipo de planejamento, no entanto, deve-se ao elevado número de experimentos exigidas na sua execução.

É possível, no entanto, utilizar apenas uma parte do tratamento fatorial completo, com o objetivo de reduzir o gasto de material e o tempo de pesquisa. A esse procedimento

dá-se o nome de planejamento experimental fatorial fracionado. Apesar de reduzir consideravelmente o número de experimentos realizados, esse método não prejudica a análise das variáveis, pois sabe-se que na prática, interações de ordem elevada podem ser desconsideradas, já que normalmente não são de interesse prático e possuem efeitos desprezíveis. Essa metodologia é usada em uma fase exploratória, em que há um grande número de variáveis a serem estudadas, e leva em consideração que os efeitos mais importantes são os principais e os de ordem baixa (duplas, triplas).

No presente trabalho, foi avaliada a influência dos parâmetros umidade (%) e volume de inóculo (mL), e da suplementação com peptona (%), óleo de soja (%), ureia (%) e glicose (%) e suas interações na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* em processo de fermentação em estado sólido utilizando torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja como matéria-prima.

3.8. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O delineamento composto central (DCC) é um dos mais populares para o ajuste de modelos de até segunda ordem. Quando comparado ao planejamento experimental fatorial completo, o DCC apresenta vantagens, pois possui um menor número de combinações entre os níveis dos fatores, de modo a melhorar o desempenho do delineamento. Tal melhora deve-se ao fato de ser demandado menos tempo de experimento, menores custos e melhor qualidade no ajuste da superfície de resposta. O DCC é viável em situações em que há um bom controle dos fatores que podem influenciar a resposta e quando o coeficiente de variação (CV) experimental for menor do que 6% e, por isso, ele foi realizado após o tratamento exploratório dado pelo planejamento experimental fatorial fracionado.

O DCC é constituído por três partes: cúbica (fatorial), axial (α) e central. De um modo geral, o DCC para k fatores é dado pelo conjunto constituído pelos seguintes tratamentos.

- Parte cúbica: $(1, 1, \dots, 1)$; $(-1, 1, \dots, 1)$; ...; $(-1, -1, \dots, -1)$, totalizando 2^k combinações;
- Parte axial: $(-\alpha, 0, \dots, 0)$; $(\alpha, 0, \dots, 0)$; $(0, -\alpha, \dots, 0)$; $(0, \alpha, \dots, 0)$; $(0, 0, \dots, -\alpha)$; $(0, 0, \dots, \alpha)$, totalizando 2^k combinações; e
- Ponto central: $(0, 0, \dots, 0)$

Dessa forma, são realizadas no total k^2+2k+1 combinações entre os níveis dos k fatores analisados.

Os pontos axiais situam-se nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm\alpha$ da origem. Esses pontos não contribuem para a estimativa das interações, mas colaboram em grande parte para a estimativa dos termos quadráticos do modelo de segunda ordem. Os pontos cúbicos são os responsáveis por estimar os efeitos das interações e são usados em ajustes de modelos de primeira ordem, com ou sem interações duplas entre os fatores. O ponto central, quando repetido, é responsável por estimar o erro puro e, além disso, pela estimativa dos efeitos quadráticos.

É possível observar a característica sequencial desse modelo, pois os pontos fatoriais auxiliam na estimativa das interações entre os fatores e dos termos lineares, ao passo que os pontos centrais informam sobre a existência de curvaturas no sistema. Caso haja a presença de curvatura, o acréscimo dos termos axiais permite a estimativa dos termos quadráticos de forma mais eficiente.

É possível usar o DCC em diferentes regiões de interesse experimental e da região de operação devido a sua flexibilidade e disponibilidade de diversas variações. Essas variações se dão em função das diversas possibilidades de escolha do valor de α , que depende em geral das regiões de interesse e operacionalidade. Os valores de α mais comumente escolhidos estão entre 1 e \sqrt{k} porque isso impede que, conforme o k aumente, os pontos axiais fiquem muito distantes do ponto central, o que impediria que a região intermediária fosse investigada.

Um fator importante é que o delineamento tenha relativa estabilidade em relação a distribuição da variância dos valores preditos da resposta. Com o objetivo de obter tal distribuição, BOX e HUNTER (1957) propuseram o conceito de rotacionalidade como critério para a escolha do α . O delineamento composto central é considerado rotacional quando as variâncias das predições da resposta variam apenas com a distância do ponto central.

Assim, o DCC pode ser considerado um delineamento composto central rotacional (DCCR) quando:

$$\pm \alpha = \pm \sqrt[k]{2}$$

k = número de fatores

O valor de α é muito importante, pois é determinante para o DCC na medida em que pode ser usado para tornar os coeficientes de regressão ortogonais ou para dar ao DCC a propriedade da rotacionalidade. Além disso, a escolha do α pode minimizar o desvio da superfície de resposta ajustada à sua forma verdadeira nos casos em que a mesma não é quadrática.

Qualquer valor pode ser escolhido para α e para o número de pontos centrais; porém, essa escolha deve ser feita no sentido de facilitar o tratamento dos dados. No caso do DCC com dois fatores, por exemplo, esse objetivo é alcançado ao escolher α igual a 1,4142 e cinco pontos centrais, pois ele passa a ter a propriedade da rotacionalidade e da ortogonalidade.

Portanto, para um determinado número de fatores e, dependendo dos valores escolhidos para α e para o número de repetições do ponto central, o DCC possibilita a escolha entre os tipos ortogonal e (ou) rotacional e a divisão ortogonalmente em blocos, além de permitir o uso de um menor número de combinações entre os níveis dos fatores estudados quando comparado ao delineamento fatorial completo.

3.8.1. Coeficiente de variação

A qualidade e confiabilidade dos experimentos realizados é uma constante preocupação em qualquer área da ciência. Assim, para tirar conclusões de forma mais segura e correta possível, é recomendável que todas as informações disponíveis sejam exploradas na avaliação e interpretação dos resultados estatísticos obtidos por meio da experimentação.

Uma das maneiras de avaliar a qualidade de um experimento é por meio da quantificação do erro experimental, que indica o controle da variabilidade casual e a precisão do experimento.

Para quantificá-lo, vamos utilizar o coeficiente de variação (CV) residual, definido como o desvio-padrão expresso em porcentagem da média, calculado da seguinte forma:

$$CV (\%) = 100 * \frac{\sqrt{QMRes}}{\bar{Y}}$$

onde: QMRes é o quadrado médio do resíduo da análise de variância

\bar{Y} é a média geral da variável resposta Y obtida no experimento

GARCIA (1989) afirma que o CV permite comparações entre variáveis e naturezas distintas no que diz respeito a precisão dos dados. Assim, quanto menor o CV, menor é o erro experimental e mais homogêneos são os dados obtidos sob as mesmas condições. Entretanto, para avaliar a mesma característica em experimentos distintos, é necessário tomar alguns cuidados.

Segundo COUTO et al (2010), a faixa de classificação e a magnitude dos coeficientes de variação variam de acordo com a natureza das variáveis observadas. Portanto, a utilização do CV como critério de análise e comparação da precisão experimental deve ser feita com atenção, pois os resultados obtidos podem ser oriundos de condições experimentais, detalhes

do planejamento, delineamentos, tratamentos e tamanhos de parcela distintos, além de características próprias da variável de estudo, que também podem influenciar os resultados.

A alteração dos valores dos coeficientes de variação em função do ramo da ciência em estudo e do tipo de variável analisada evidencia a necessidade de haver referenciais diferenciados em relação a análise de precisão dos experimentos.

Apesar de todas as considerações que devem ser feitas quanto a classificação e avaliação dos coeficientes de variação, FERREIRA (1991) propôs classificá-los da seguinte forma em relação à precisão experimental:

Ótima: $CV \leq 10\%$;

Boa: $10 < CV \leq 15\%$;

Regular: $15 < CV \leq 20\%$

Ruim: $20 < CV \leq 30\%$

Péssima: $CV > 30\%$

3.8.2. Intervalo de confiança

Além da estimativa do valor pontual de um parâmetro, em diversas situações, é importante dispor de um intervalo que indique a confiança que se pode depositar na estimativa pontual (PIRES, 2000). Assim, o intervalo de confiança (IC) é uma estatística intervalar de um parâmetro. Em vez de estimá-lo por um único valor, é dado um intervalo de estimativas.

Intervalos de confiança podem ser usados para indicar a confiabilidade da estimativa. Por exemplo, um IC pode ser usado para descrever quão confiáveis são os resultados de uma pesquisa já que aquelas que apresentarem intervalos de confiança menores podem ser consideradas mais confiáveis do que as que resultam em um IC maior. Em suma, quanto maior for o IC, maior é a probabilidade de encontrar valores discrepantes para um mesmo parâmetro.

O intervalo de confiança é fortemente influenciado pelo desvio-padrão residual. Em um experimento onde há muita ocorrência de erro aleatório, é possível que esse erro provoque um afastamento da estimativa do parâmetro em relação ao seu verdadeiro valor.

Portanto, para experimentos com altos valores de coeficiente de variação devido a uma forte presença de erro experimental, ocorrerá um aumento do intervalo de confiança para qualquer um dos parâmetros estudados.

4. ANÁLISE MERCADOLÓGICA

Segundo FREEDONIA (2018), o mercado global de enzimas movimentou 4,4 bilhões de dólares em 2018 e tem projeção de crescimento de 4,0% ao ano, de modo a atingir 5,0 bilhões de dólares em 2021. Esse aumento deve-se ao aumento da demanda por produtos que utilizam enzimas em seus processos de produção, como na indústria alimentícia, de bebidas, detergentes e biocombustíveis. Dentre os vários tipos de enzimas comercializadas, as que se destacam são as carboidrases, proteases, polimerases, nucleases e lipases.

Impulsionadas por sua versatilidade, as lipases apresentam destaque no cenário mundial de enzimas pois permitem a catálise de reações de hidrólise e de síntese, muitas vezes de forma quimio e regioseletiva. Esta característica faz com que as lipases apresentem aplicação em vários setores, como por exemplo, na indústria alimentícia, farmacêutica, de química fina, oleoquímica, dentre outros. Dessa forma, as lipases representam 5% do mercado mundial de enzimas, com projeção de crescimento da demanda em 7,9% ao ano.

As lipases obtidas de microrganismos são as mais utilizadas em nível industrial, devido à sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. Os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação.

Neste mercado, as empresas que comercializam lipases com maior destaque no cenário mundial são a líder mundial Novozymes A/S; seguida por DSM e DuPont, além da AB Enzymes; Advanced Enzyme Technologies Limited; Biocatalysts LTD.; Buckman Laboratories INC.; Enzyme Solutions PTY. LTD.; e Specialty Enzymes & Biotechnologies CO (Bcc Research, 2014). A Novozymes é uma empresa de origem dinamarquesa, presente em 130 países e que detém aproximadamente 47% do mercado global de enzimas.

As empresas competem principalmente com base na qualidade do produto, seu desempenho e capacidade de inovação. A América do Norte e Europa são os maiores consumidores de lipases industriais, embora a Ásia esteja passando por um crescimento acentuado devido à demanda gerada pela China, Japão e Índia, refletindo a força das economias destes países nos dias atuais (ADRIO e DEMAİN, 2014).

Com o intuito de analisar a incidência de artigos e patentes publicados sobre os temas abordados no presente trabalho, realizou-se o mapeamento tecnológico na base Scopus (Elsevier). A metodologia consistiu em buscar as palavras-chave deste trabalho nos campos

Título, Resumo e Palavra-chave das bases de artigos e patentes. Tanto artigos quanto patentes foram divididos de acordo com o ano de publicação. Além disso, analisou-se os países de publicação dos artigos e os escritórios responsáveis pelas patentes. Os resultados encontram-se abaixo:

1. Lipase

Ao buscar apenas a palavra “lipase”, foram encontrados 77.009 artigos e 120.112 patentes, distribuídos ao longo dos anos conforme os gráficos abaixo:

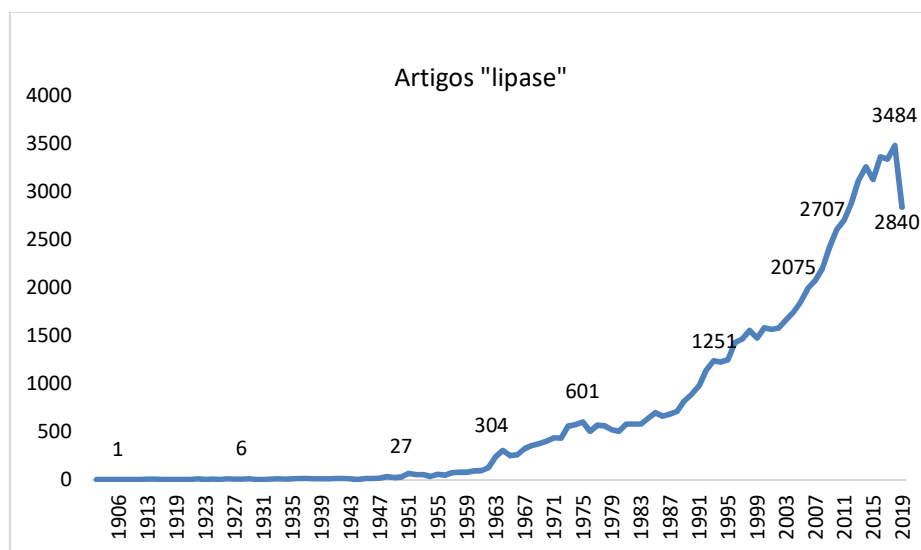


Figura 7: Número de artigos publicados por ano com a palavra-chave “lipase”

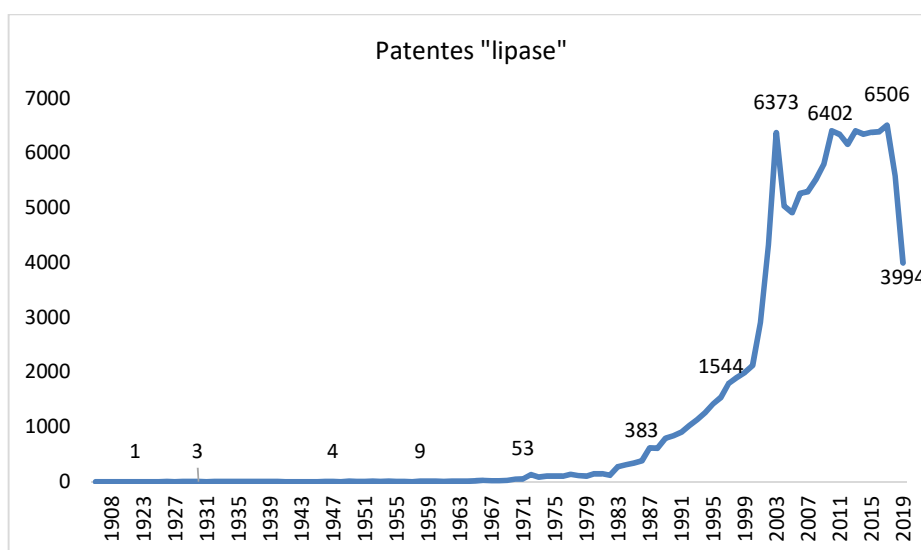


Figura 8: Número de patentes reconhecidas por ano com a palavra-chave “lipase”

É possível observar que, a curva de artigos publicados tem a parte ascendente iniciada na década de 60, tendência que se inicia apenas nos anos 80 na curva de patentes. Ambas as curvas atingem seu ponto máximo nos anos 2000, sendo os maiores números registrados em 2018 para artigos (3.484) e em 2017 para patentes (6.506). Em 2019, os valores registrados são consideravelmente menores que os dos anos anteriores, indicando o início de uma possível fase de maturidade do tema.

Em termos de distribuição desses artigos e patentes ao redor do mundo, os Estados Unidos lideram o tema, ficando muito a frente do segundo colocado em ambos os gráficos, como pode ser observado abaixo. O Brasil figura entre os países que mais estudaram o tema “lipases”, ocupando a 12ª posição no ranking, com um total de 2.110 artigos publicados.

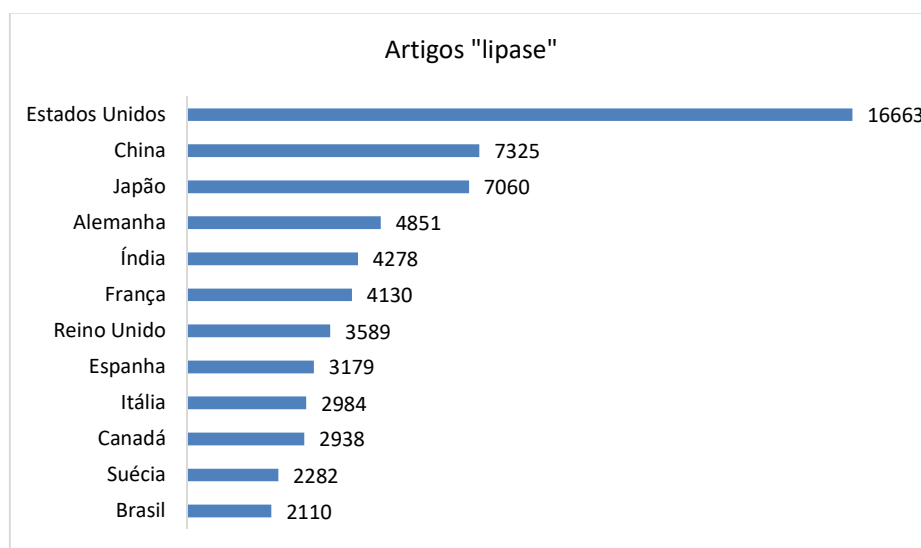


Figura 9: Número de artigos publicados por país com a palavra-chave “lipase”

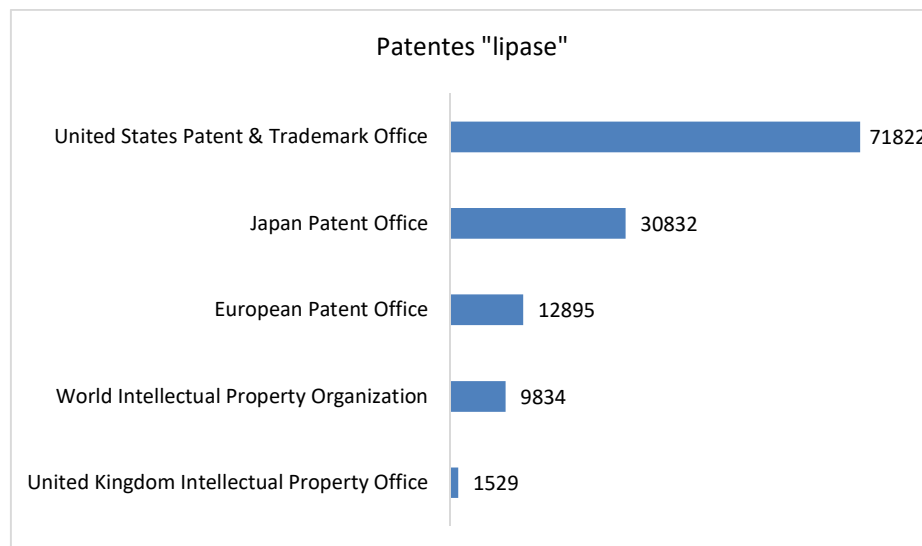


Figura 10: Número de patentes reconhecidas por banco com a palavra-chave “lipase”

2. *Yarrowia lipolytica*

Ao buscar apenas as palavras “yarrowia + lipolytica”, foram encontrados 3.108 artigos e 11.312 patentes, distribuídos ao longo dos anos conforme os gráficos abaixo:

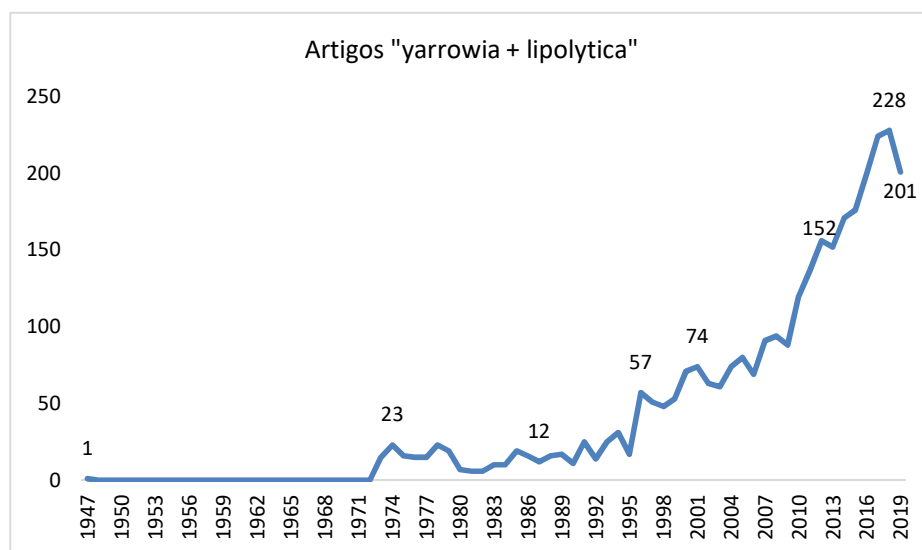


Figura 11: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “yarrowia + lipolytica”

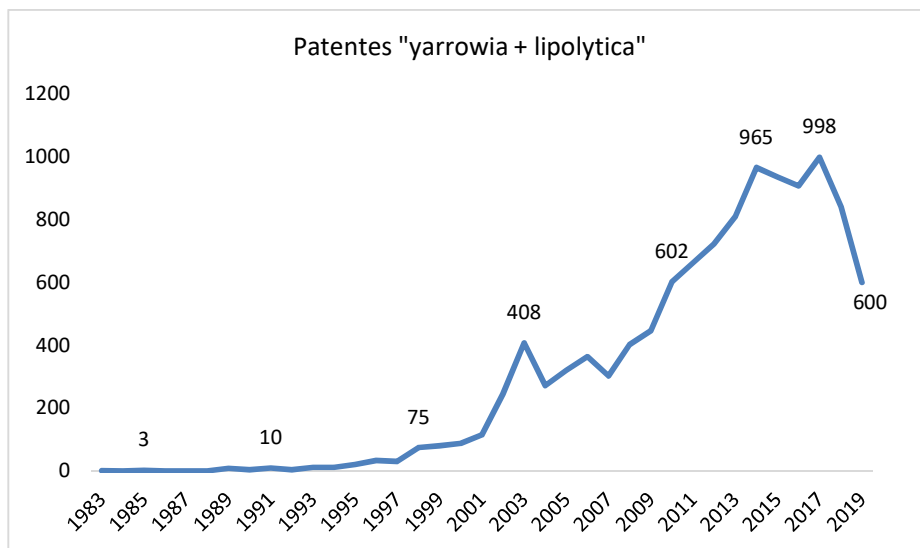


Figura 12: Número de patentes reconhecidas por ano com as palavras-chave “yarrowia + lipolytica”

Ao buscar as palavras-chave “yarrowia + lipolytica”, observa-se que ascensão do tema se inicia nos anos 90, seguida pela curva de patentes, cujos valores começam a aumentar nos anos 2000. É interessante observar que tanto para lipase quanto para *Yarrowia lipolytica*, o aumento do número de patentes se inicia dez anos após o aumento do número de artigos, demonstrando que os estudos realizados foram de fato convertidos em práticas industriais e de pesquisa.

A França, os Estados Unidos e a China lideram o ranking de número de artigos, enquanto o Brasil ocupa a décima posição, com 119 publicações. Em relação às patentes, os Estados Unidos (por meio do *United States Patent & Trademark Office*) apresentam grande vantagem em relação aos demais, com número de patentes quase 5 vezes maior que o segundo colocado *Japan Patent Office*.

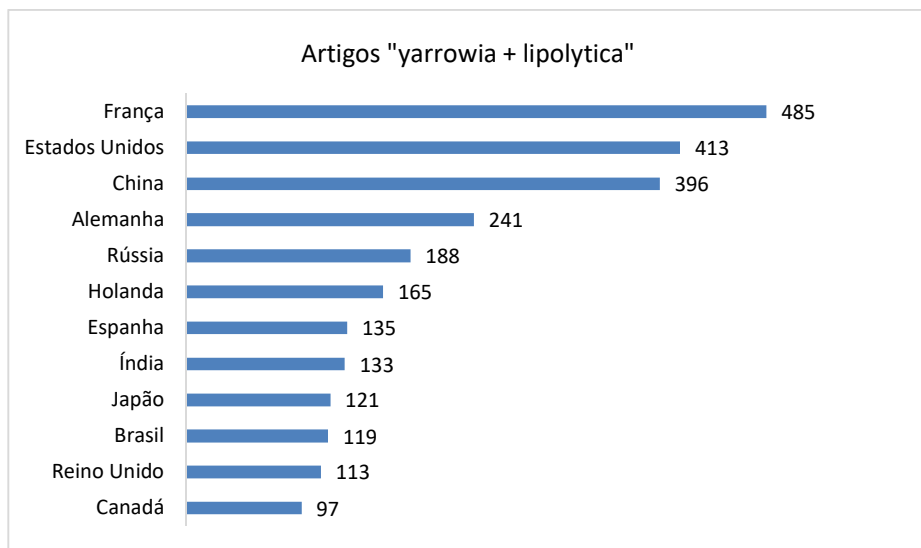


Figura 13: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “yarrowia + lipolytica”

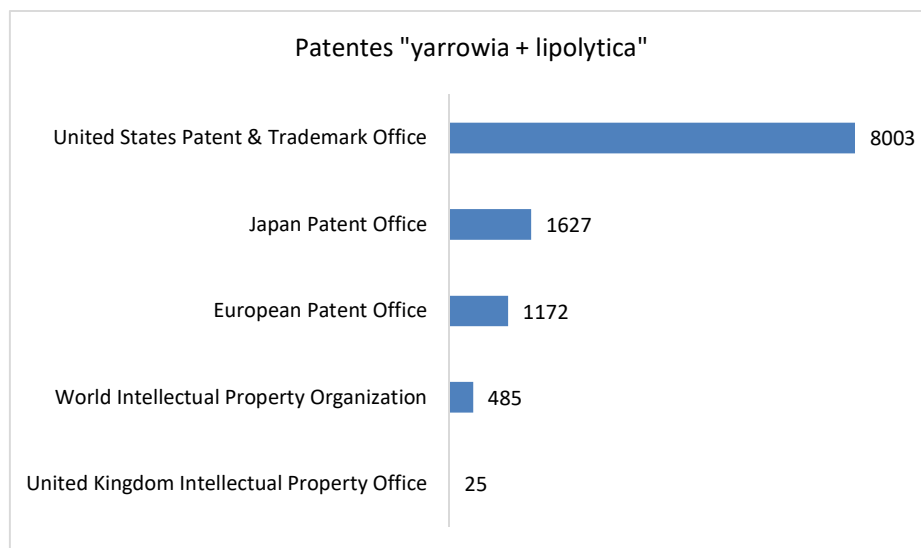


Figura 14: Número de patentes reconhecidas por banco com as palavras-chave “yarrowia + lipolytica”

3. Solid state fermentation (fermentação no estado sólido)

Ao buscar as palavras “solid + state + fermentation”, foram encontrados 7.024 artigos e 128.551 patentes, distribuídos ao longo dos anos conforme os gráficos abaixo:

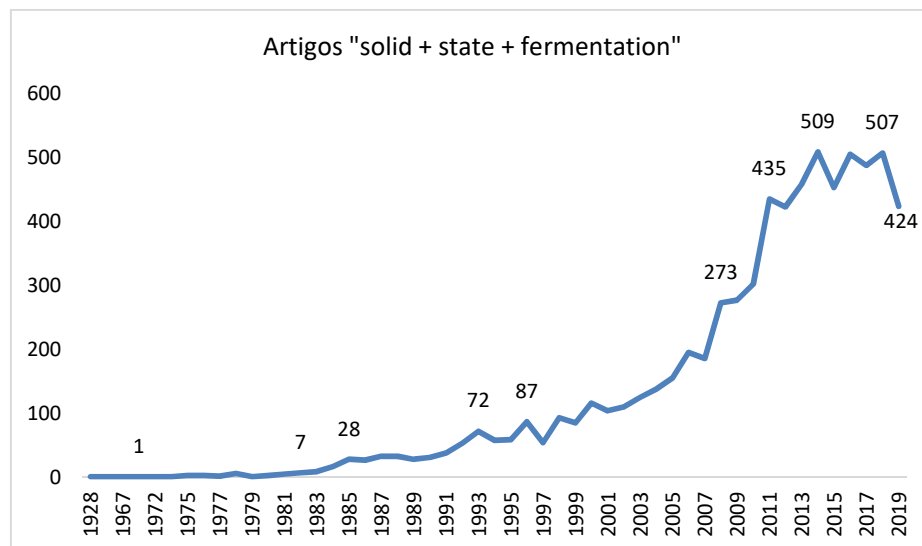


Figura 15: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “solid + state + fermentation”

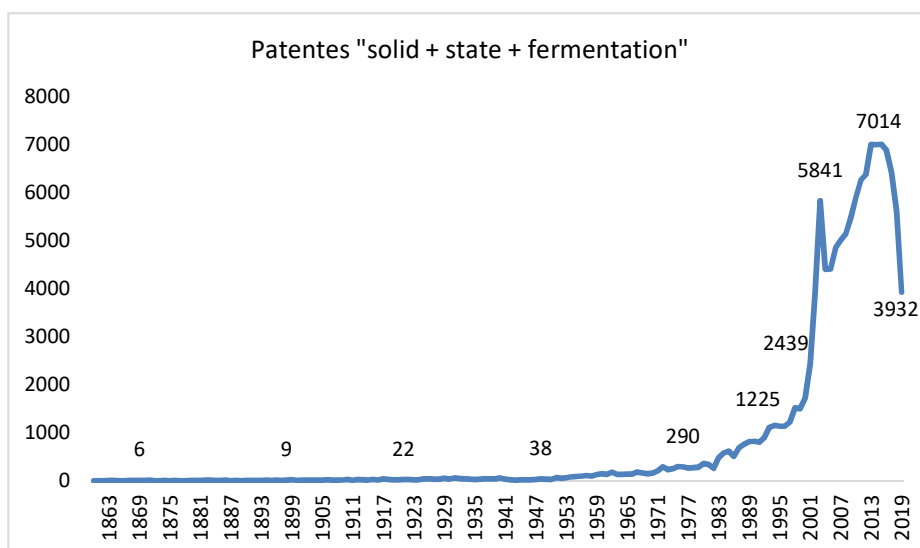


Figura 16: Número de patentes reconhecidas por ano com as palavras-chave “solid + state + fermentation”

Ao procurar pelas palavras chave “solid + state + fermentation” (fermentação no estado sólido), observa-se uma tendência muito semelhante à pesquisa por “yarrowia + lipolytica”, com ascensão do tema nos anos 90, seguida pela curva de patentes, cujos valores começam a aumentar nos anos 2000. A curva de patentes atinge seu pico no ano de 2015, com 7.014 patentes reconhecidas.

Geograficamente, Índia, China e Brasil lideram o ranking de países em termos de artigos publicados, demonstrando uma variação ao que foi observado nas duas pesquisas anteriores nas quais países da Europa e os Estados Unidos ocupavam essas posições. É interessante observar que, em termos de patentes, os Estados Unidos continuam como o maior país emissor, demonstrando uma alta capacidade de converter as pesquisas realizadas em tecnologias de processo efetivas.

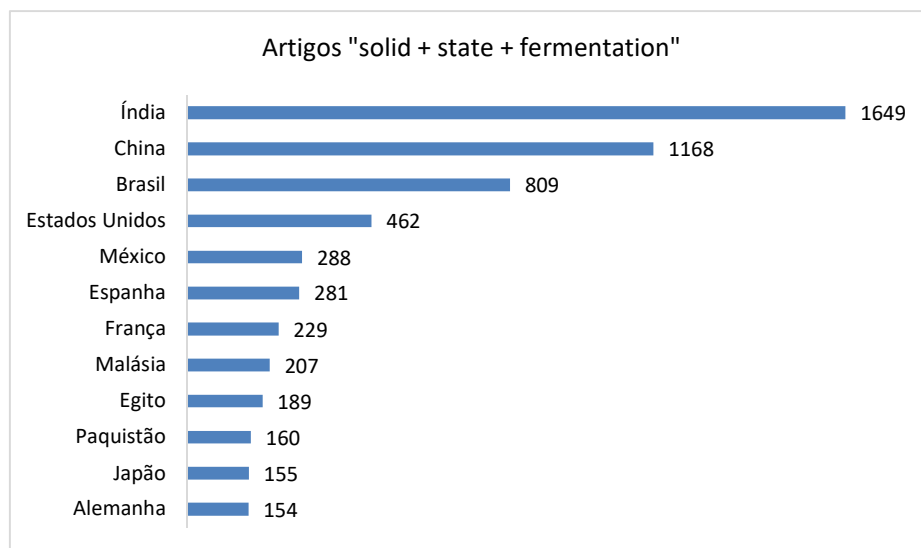


Figura 17: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “solid + state + fermentation”

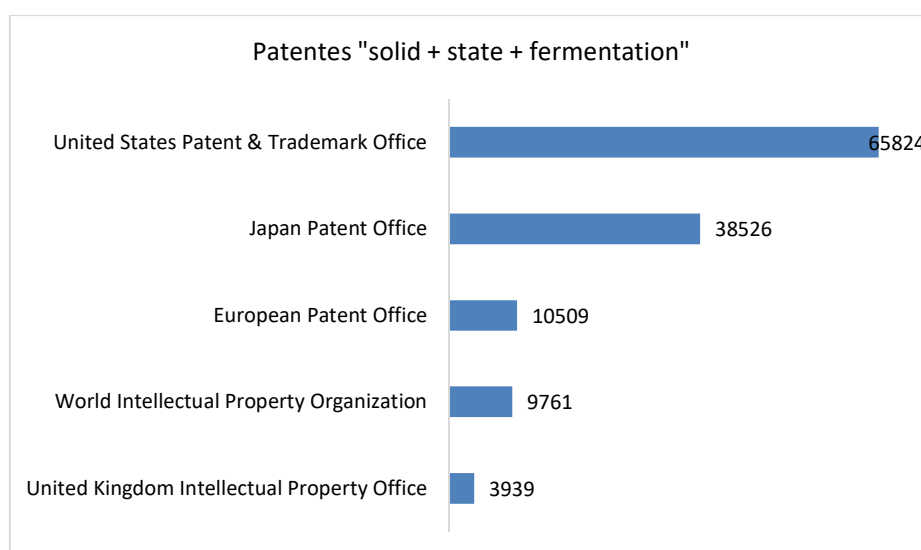


Figura 18: Número de patentes reconhecidas por banco com as palavras-chave “solid + state + fermentation”

4. Lipase + *Yarrowia lipolytica*

Ao buscar as palavras “lipase + yarrowia + lipolytica”, foram encontrados 362 artigos e 4.162 patentes, distribuídos ao longo dos anos conforme os gráficos abaixo:

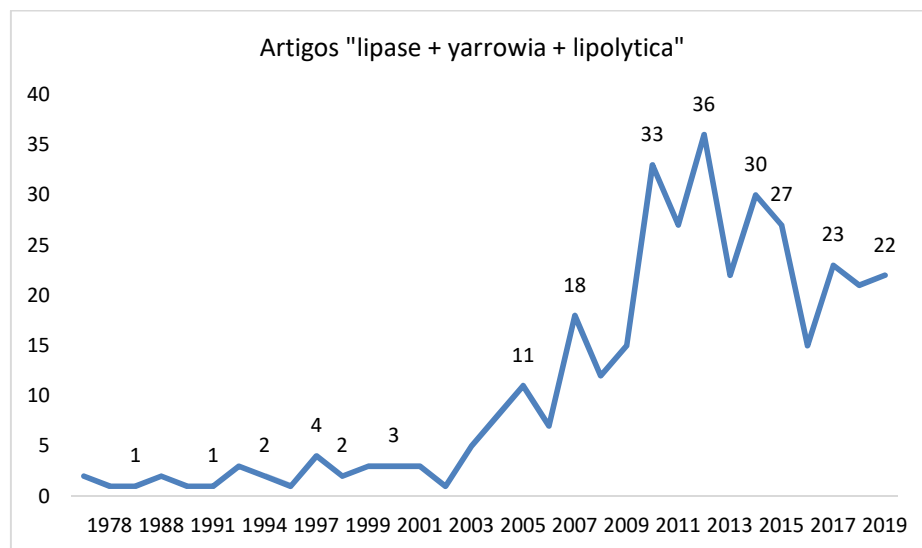


Figura 19: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolytica”

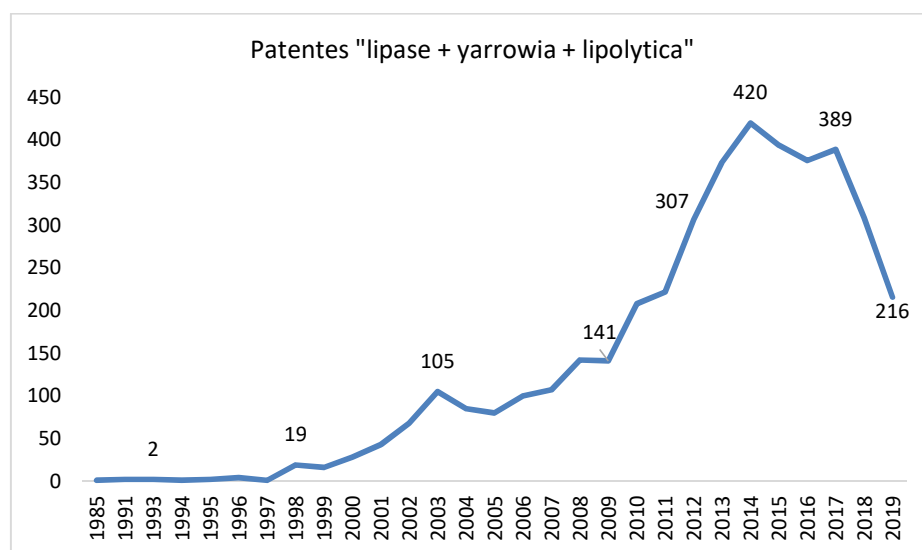


Figura 20: Número de patentes reconhecidas por ano com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolytica”

Nesse caso, observamos números menores de artigos e patentes publicados em relação às três pesquisas anteriores, demonstrando que a utilização de *Yarrowia lipolytica* para a produção de lipases é um tema recente e ainda pouco explorado. A maior incidência de publicações se deu ao longo dos últimos 10 anos, com valores máximos em 2012 para artigos (36) e em 2014 para patentes (420).

A China e a França são os países com mais artigos publicados: 86 e 62, respectivamente. O Brasil se encontra na quarta posição, com 32 publicações. Assim como na pesquisa que usou “solid + state + fermentation” como palavra-chave, em termos de patentes, os Estados Unidos continuam como o maior país emissor, mesmo tendo poucos artigos sobre o tema.

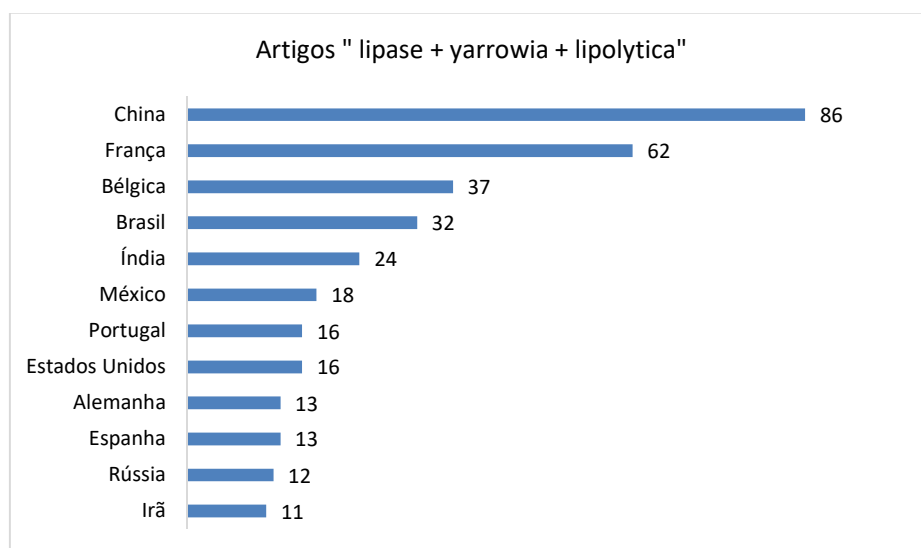


Figura 21: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca”

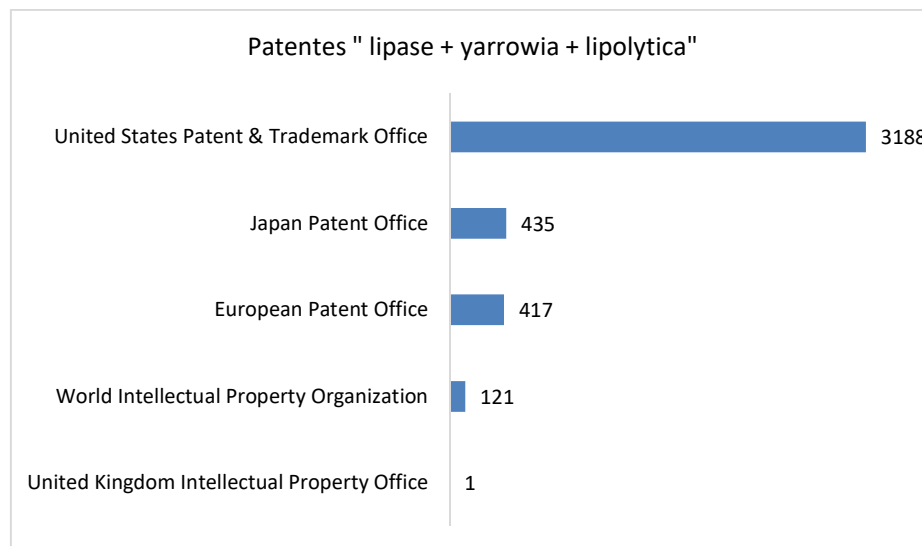


Figura 22: Número de patentes reconhecidas por banco com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca”

5. Lipase + *Yarrowia lipolityca* + solid state fermentation

Ao buscar as palavras “lipase + yarrowia + lipolityca + solid + state + fermentation”, foram encontrados 15 artigos e 2.936 patentes, distribuídos ao longo dos anos conforme os gráficos abaixo:

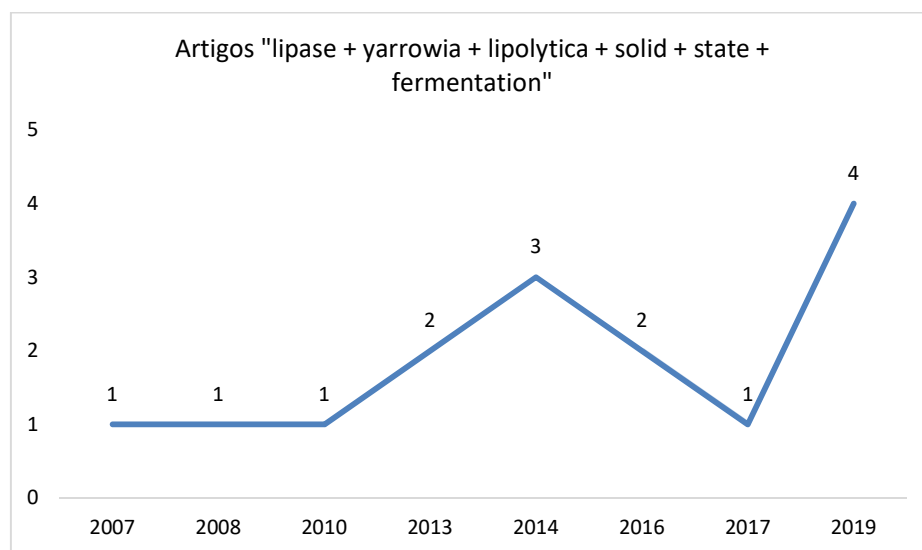


Figura 23: Número de artigos publicados por ano com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca + solid + state + fermentation”

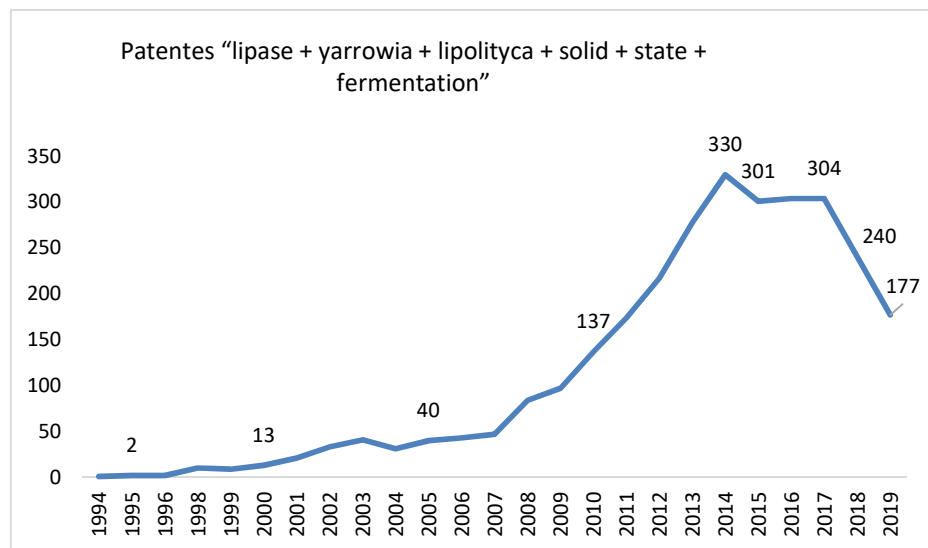


Figura 24: Número de patentes reconhecidas por ano com as palavras-chave "lipase + yarrowia + lipolytica + solid + state + fermentation"

Nesse cenário, observa-se uma tendência diferente das demais pesquisas, pois o número de artigos e patentes realizados é muito inferior, demonstrando que o uso de fermentação no estado sólido com *Yarrowia lipolytica* para a produção de lipases ainda é uma tecnologia recente e embrionária, com muito potencial a ser explorado. Além disso, o Brasil lidera o ranking em termos de artigos, seguido por Índia e China, ao passo que os Estados Unidos seguem líderes em relação ao número de patentes reconhecidas.

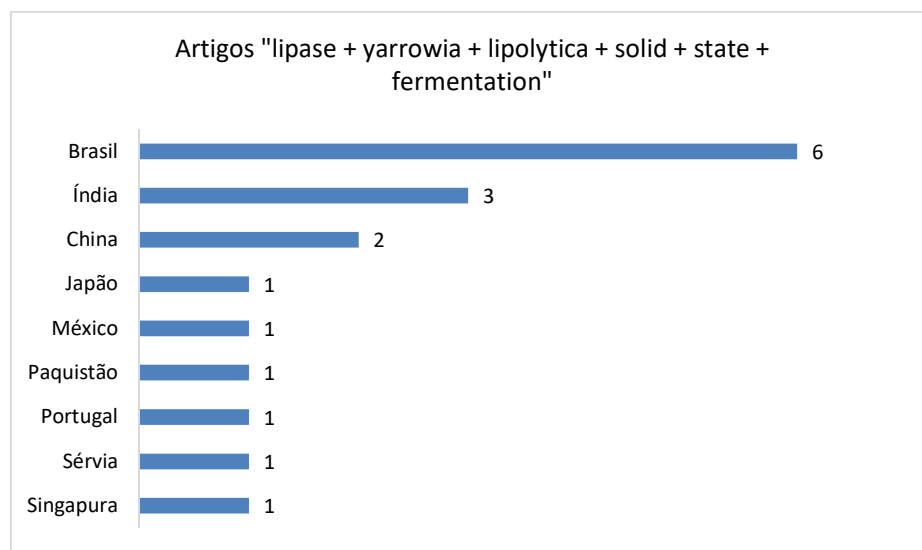


Figura 25: Número de artigos publicados por país com as palavras-chave "lipase + yarrowia + lipolytica + solid + state + fermentation"

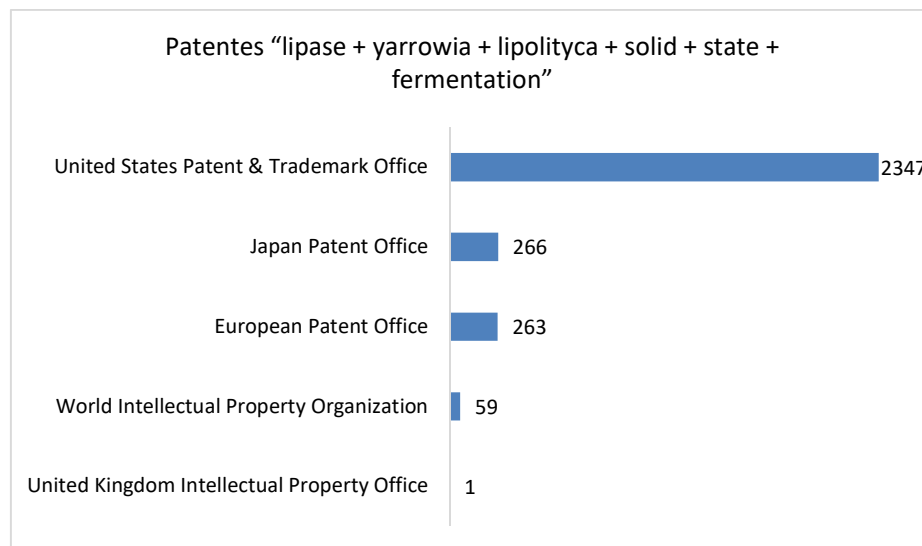


Figura 26: Número de patentes reconhecidas por banco com as palavras-chave “lipase + yarrowia + lipolityca + solid + state + fermentation”

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Microrganismo e meio de manutenção

Para o presente trabalho foi utilizada a cepa de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 isolada do estuário da baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil por Haegler e Mendonça-Haegler (1981). As células foram conservadas a 4°C em tubos de ensaio com meio YPD (“Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar-agar 2%.

Previamente a inoculação das células de *Y. lipolytica* ao meio de FES, um pré-inóculo foi realizado em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio YPD (“Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2% e glicose 2%.

Foi adicionada uma alçada de células previamente cultivadas em meio YPD-ágar inclinado (meio de manutenção) e a mistura foi agitada em placa a 160 rpm e 28 °C por 72 horas.

5.2. Preparo das matérias-primas

Anteriormente ao início das fermentações e inoculação das células de *Y. lipolytica* ao meio fermentativo, as matérias-primas utilizadas (tortas de cupuaçu, andiroba e farelo) foram esterilizadas em autoclave a 1,0 atm por 20 minutos.

5.3. Inoculação do meio fermentativo

Em todas as etapas, o meio fermentativo foi preparado em capela de fluxo laminar, adicionando-se a matriz sólida (torta de andiroba ou cupuaçu e/ou farelo de soja), água (pura ou com suplementos) e inóculo celular em biorreatores de prolipopileno de 250 mL. Posteriormente, a mistura foi agitada manualmente, para homogeneização dos componentes e melhor aeração da torta, e protegida com tecido hidrofóbico. Tanto as tortas de andiroba e cupuaçu quanto o farelo de soja selecionados apresentavam granulometria menor ou igual a 1,18 mm.

Na fermentação não-suplementada, a matriz sólida era composta apenas pela torta de andiroba ou cupuaçu e a umidade foi ajustada pela adição de água destilada.

Na fermentação suplementada com farelo de soja, a matriz sólida era composta pela torta de andiroba ou cupuaçu adicionadas de farelo de soja e a umidade foi ajustada pela adição de água destilada.

Para a realização do planejamento experimental fatorial fracionário (PEFF), a matriz sólida era composta pela torta de andiroba ou cupuaçu adicionadas de farelo de soja e a umidade foi ajustada pela adição de emulsões contendo óleo de soja, ureia, peptona e glicose.

Para a realização do delineamento composto central rotacional (DCCR), a matriz sólida era composta pela torta de andiroba ou cupuaçu adicionadas de farelo de soja e a umidade foi ajustada pela adição de emulsões contendo óleo de soja, ureia e peptona.

Abaixo, a Tabela 5 resume os parâmetros utilizados em cada uma das etapas fermentativas.

Tabela 5: Parâmetros utilizados em cada etapa fermentativa

Componente	Fermentação não suplementada	Fermentação suplementada com farelo de soja	Planejamento experimental fatorial fracionário	Delineamento composto central rotacional
Torta de andiroba ou cupuaçu	10,0 g	6,7 g	6,7 g	6,7 g
Farelo de soja	-	3,3 g	3,3 g	3,3 g
Umidade	60 %	60 %	50 a 70 %	55 %
Concentração de células (mg células / g torta/farelo seco)	0,69	0,69	0,69 a 2,07	2,07

O ajuste de umidade foi realizado segundo a relação abaixo:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100$$

m₁: massa da amostra após a adição de água

m₂: massa inicial da amostra

5.4. Fermentação no estado sólido

A FES foi conduzida durante diferentes intervalos de tempo em estufa incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), com controle de temperatura a 28 °C e umidade a 99%, com o intuito de manter a umidade do meio constante. Após cada um dos intervalos de tempo indicados abaixo, biorreatores em duplicatas foram retirados, da câmara de fermentação para obtenção do extrato enzimático.

Na fermentação não-suplementada, os extratos enzimáticos analisados foram obtidos após 10, 20, 24, 28, 32 e 48 horas do início da fermentação. Na fermentação suplementada com farelo de soja, os extratos enzimáticos analisados foram obtidos após 7, 10, 14, 24, 28, 32, 36, 40, 44 e 48 horas do início da fermentação.

Para a realização do planejamento experimental fatorial fracionário (PEFF), os extratos enzimáticos analisados foram obtidos após 14 horas do início da fermentação. Para a realização do delineamento composto central rotacional (DCCR), os extratos enzimáticos analisados foram obtidos após 24 horas do início da fermentação. Abaixo, a Tabela 6 resume os intervalos de tempo avaliados em cada uma das etapas fermentativas.

Tabela 6: Intervalos de tempo de fermentação avaliados em cada etapa fermentativa

Tempo de Fermentação (horas)	Fermentação não suplementada	Fermentação suplementada com farelo de soja	Planejamento experimental fatorial fracionário	Delineamento composto central rotacional
7		X		
10	X	X		
14		X	X	
20	X			
24	X	X		X
28	X	X		
32	X	X		
36		X		
40		X		
44		X		
48	X	X		

5.5. Obtenção do extrato enzimático

O extrato enzimático foi produzido por meio da adição de 50 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 a cada um dos reatores. Em seguida, os mesmos foram incubados a 35 °C em agitador orbital a 200 rpm durante 20 minutos. A extração da fração líquida foi realizada por prensagem manual em filtro que, posteriormente, foi agitada em centrífuga a 3000 rpm por 5 minutos para que ocorresse a separação dos sólidos finos e células em suspensão. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado por pipetagem e armazenado em frascos de polipropileno em refrigerador a 10°C.

5.6. Planejamento experimental fatorial fracionário (PEFF)

O PEFF 2⁽⁶⁻²⁾ foi aplicado para avaliar a relevância dos parâmetro indicados na Tabela 7. O ponto central foi realizado em triplicata.

Tabela 7: Parâmetros variáveis no planejamento experimental fatorial fracionário

Parâmetros Variáveis	Intervalo de Confiança
Umidade	50 a 70%
Concentração de células (mg células/g torta/farelo seco)	0,69 a 2,07
Ureia	0 a 3,0% p.p
Peptona	0 a 3,0% p.p
Glicose	0 a 3,0% p.p
Óleo de soja	0 a 3,0% p.p

5.7. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

O DCCR 2³ foi aplicado para avaliar a relevância dos parâmetro indicados na Tabela 8. O ponto central foi repetido três vezes.

A matriz experimental foi avaliada pela análise da variância (ANOVA) em um intervalo de confiança de 90 % (valor de $p < 0,1$) para a fermentação utilizando a torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja por 24 horas.

Tabela 8: Parâmetros variáveis no delineamento composto central rotacional

Parâmetros Variáveis	Intervalo de Confiança
Ureia	0 a 3,0% p.p
Peptona	0 a 3,0% p.p
Óleo de soja	0 a 3,0% p.p

5.8. Determinação da umidade

Para cada um dos intervalos de tempo de fermentação, amostras em triplicata da torta tiveram sua umidade medida em balança de umidade modelo Bel 163I a uma temperatura de 110 °C. Esse equipamento promove o aquecimento da amostra por meio de uma lâmpada de infravermelho para que a água presente evapore e, quando o material analisado alcança peso constante, calcula o percentual de umidade, considerando que toda a massa perdida foi a água que evaporou.

5.9. Determinação do pH

O pH foi quantificado em cada um dos intervalos de tempo da fermentação, em duplicatas, por meio de pHmetro modelo Digimed DM-22, calibrado com tampões padrão 4,1 e 6,8 a temperatura ambiente (25°C).

5.10. Quantificação da atividade lipolítica pelo método titulométrico

A determinação da atividade lipolítica foi realizada pelo método titulométrico, utilizando como substrato 19 mL de emulsão de óleo de oliva 5% (m/v) e goma arábica 5% (m/v) em de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0. O preparo da emulsão ocorreu em um Ultraturrax, a 10.000 rpm por 3 minutos.

O ensaio foi realizado sob agitação magnética (200 rpm), a 37°C, sendo iniciado pela adição de 1 mL da preparação enzimática, previamente aquecida à temperatura de ensaio. Após 20 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de uma mistura etanol e acetona (1:1 v/v).

Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados pela titulação com solução 0,04 mol/L de NaOH em titulador automático Metrohm 916 Ti-touch até um valor de pH final de 11,0 (FREIRE et al., 1997).

O branco da reação foi obtido pela inativação da enzima por adição prévia da mistura etanol-acetona (1:1 v/v) ao meio reacional. Uma unidade de atividade enzimática (1U) corresponde à quantidade de enzima que produz 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições de ensaio e o cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com a equação abaixo.

$$A = \frac{(V - V_b) * M * 1000}{t * C}$$

onde:

A é a atividade lipolítica (U/mL)

V é o volume de solução de NaOH gasto para a titulação da amostra (mL)

V_b é a volume de solução de NaOH gasto para a titulação do branco (mL)

M é a molaridade da solução de NaOH (mmol/mL)

t é o tempo de reação (min)

C é o volume do extrato bruto de lipase (mL) utilizado na reação

A atividade lipolítica por grama (U/g) é calculada por meio da multiplicação da atividade em U/mL pelo volume de tampão utilizado na extração dividido pelo peso seco da amostra fermentada, se utilizado o extrato enzimático bruto de lipase.

5.11. Quantificação da atividade proteolítica pelo método espectrofotométrico

A medida de atividade de protease foi realizada segundo PINTO (1998). O extrato enzimático foi adicionado a uma solução de azocaseína 0,5 % em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 em iguais proporções (1,0 mL) e a mistura incubada por 40 minutos a 32°C. Após esse tempo, adiciona-se 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA), objetivando a precipitação de proteínas não hidrolisadas pela protease. Em seguida, centrifuga-se a amostra (3.000 g, 10 minutos) e 2,0 mL do sobrenadante eram transferidos para um novo tubo ao qual se adiciona 2,0 mL de KOH 5 N. A reação gera uma cor laranja, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro a 428 nm, contra um branco. O branco de reação foi obtido pela adição de TCA antes da adição do extrato enzimático. O cálculo da atividade é realizado utilizando a equação a seguir:

$$A = \frac{(Absi * fi - Absb * fb)}{t * V}$$

onde:

A = atividade da enzima (U L⁻¹), onde uma unidade de atividade (1U) corresponde à diferença unitária de absorvância a 428 nm por minuto de reação entre a amostra e o branco de reação nas condições de reação.

Absi = absorvância da amostra;

fi = diluição da amostra;

Absb = absorvância do branco;

fb = diluição do branco;

V = volume de amostra (L);

t = tempo de reação (min).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análise Bromatológica

A análise bromatológica foi realizada pelo Laboratório de Controle Bromatológico e Microscópico, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e os resultados encontram-se nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Composição centesimal, fibras totais e valor calórico total das tortas de cupuaçu e andiroba

	Cupuaçu	Andiroba
Umidade (%)	4,71	7,26
Cinzas (%)	7,24	4,22
Proteínas (%)	14,86	7,95
Extrato Etéreo (%)	20,98	20,01
Carboidratos-Nifext (%)*	21,96	17,76
Fibras Insolúveis - FDA (%)	23,67	37,69
Fibras Insolúveis - NDF (%)	29,93	42,79
Hemicelulose (%)	6,27	5,10
Celulose (%)	13,01	15,30
Lignina (%)	10,66	22,39
Valor Calórico Total (Kcal/100g)	339,00	282,92

*Descontando o teor de fibras solúveis

É possível observar que a umidade íntinseca à torta de andiroba (7,26%) é maior que a do cupuaçu (4,71%). Por outro lado, o percentual de proteínas presentes na torta de cupuaçu (14,86%) é aproximadamente o dobro do valor observado na torta de andiroba (7,95%), enquanto que no farelo de soja esse nutriente representa 51,41% da amostra. Além disso, a quantidade de fibras insolúveis (FDA) presentes nas amostras de cupuaçu e andiroba foi consideravelmente maior que a observada no farelo de soja, indicando que essa matéria prima apresenta maior biodisponibilidade de nutrientes para a *Y. lipolytica*.

Tabela 10: Composição centesimal, fibras totais e valor calórico total do farelo de soja

Matéria seca (MS)	88,87
Matéria orgânica (MO)	93,61
Cinza	6,39
Proteína bruta (PB)	51,41
Extrato etéreo (EE)	3,45
Fibra Bruta (FB)	6,18
FDN	12,22
FDA	10,13
Lignina	3,00
Sílica	-
Energia bruta(EB) (Mcal/kg de MS)	4,64

6.2. Perfil de pH

Durante as etapas iniciais de fermentação não suplementada, usando cupuaçu ou andiroba adicionados de farelo de soja, o pH foi medido em duplicata em cada um dos intervalos de tempo nos quais a fermentação foi interrompida para obtenção do extrato enzimático. Os resultados estão apresentados nas Figuras 27 e 28.

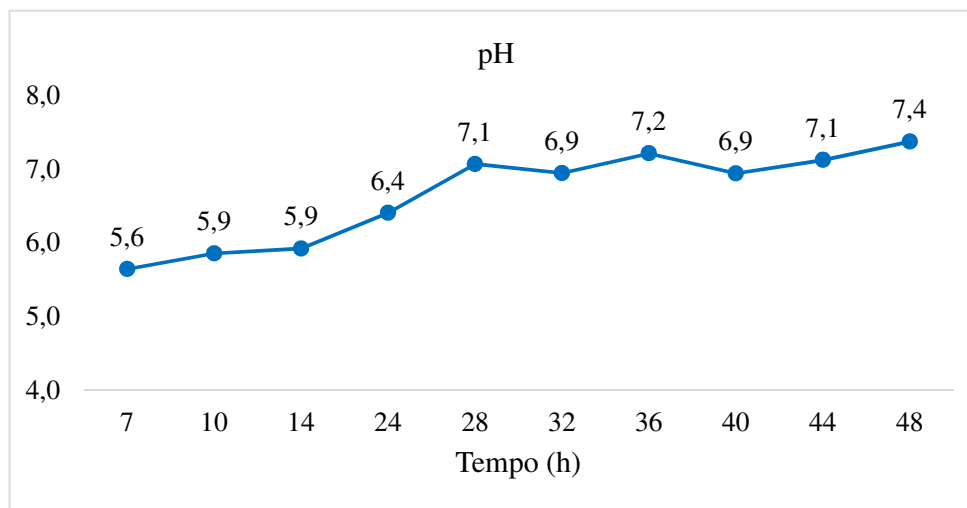


Figura 27: Perfil de pH após 48 horas de fermentação em torta de andiroba adicionada de farelo de soja

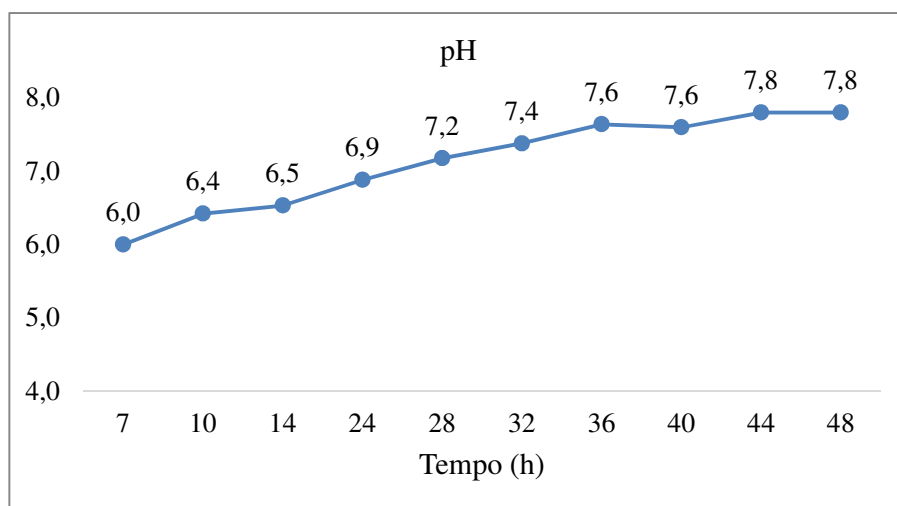


Figura 28: Perfil de pH após 48 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja

Na fermentação que teve como matéria-prima a andiroba adicionada de farelo de soja, observou-se que o pH apresentou variação no decorrer do experimento, pois no início da fermentação o pH foi medido em 5,6 e, após 48 horas, seu valor foi 7,4.

Na fermentação em que se utilizou o cupuaçu adicionado de farelo de soja como fonte de nutrientes, assim como no caso da andiroba, houve ligeiro aumento do valor do pH, pois após 7 horas de experimento o valor medido foi de 6,0 e, após 48 horas de fermentação, seu valor foi 7,8.

Tais observações suportam a hipótese de que a levedura *Y. lipolytica* realizou a fermentação dentro da faixa ideal de pH, sem que nenhum estresse iônico interferisse na produção de lipases e proteases. Além disso, pode-se concluir que a produção proteases pelo microrganismo ocorreu em quantidades suficientes para hidrolisar as proteínas presentes no meio, liberando compostos com grupamento amino, que, ao formar amônia, retiram íons hidrogênio do meio, de modo a causar a elevação de pH observada.

Na primeira etapa de fermentação com suplementação, na qual foi realizado o planejamento experimental fatorial fracionário, o pH do meio de reação foi acompanhado durante as primeiras 36 horas de experimento, conforme apresentado na Figura 29.

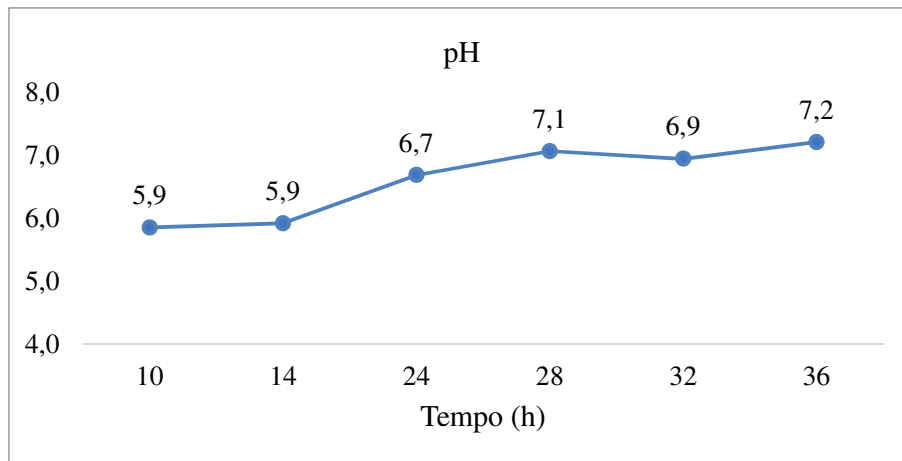


Figura 29: Perfil de pH após 36 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja e suplementação externa

É possível observar que houve certa tendência de elevação do pH, já que no primeiro ponto de análise (após 10 horas de fermentação), o valor medido foi de 5,9 e, após 36 horas, foi de 7,2.

A fermentação suplementada apresentou um perfil de pH ao longo de 36 horas semelhante a do experimento sem suplementação externa. Pode-se concluir, assim, que a presença das substâncias de suplementação (ureia, peptona, glicose e óleo de soja) não interferiu significativamente no pH do meio fermentativo. Em adição a isso, foi possível observar a mesma tendência de crescimento do pH, característica esperada devido à produção de proteases por *Yarrowia lipolytica*.

RIGO(2009) e PALMA et al. (2000) observaram semelhante elevação do pH em experimentos utilizando *Penicillium restrictum* para a produção de lipases em fermentação no estado sólido e atribuíram esse fenômeno ao consumo de ácidos graxos pelo microrganismo.

6.3. Perfil de umidade

Assim como na análise de pH, para avaliar o comportamento da umidade ao longo da fermentação, nas etapas de fermentação não suplementada, amostras da torta foram analisadas, em duplicata, em balança de umidade. Os valores encontrados encontram-se nas Figuras 30 e 31.

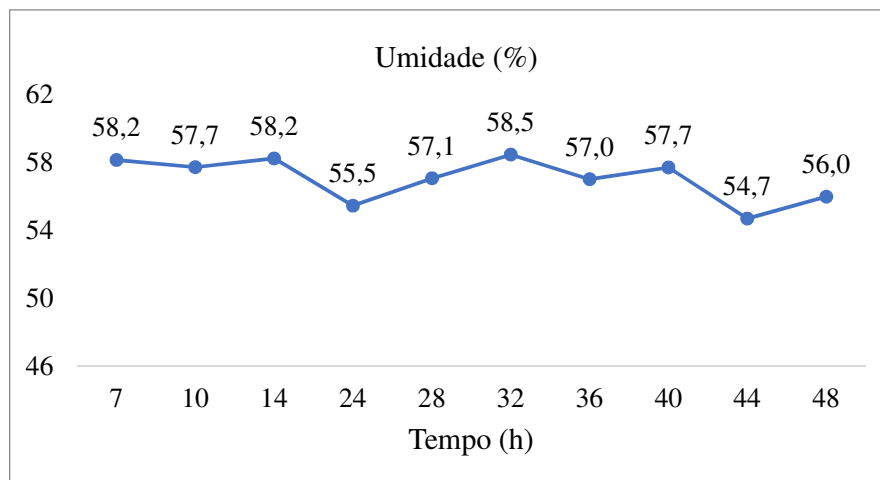


Figura 30: Perfil de umidade após 48 horas de fermentação em torta de andiroba adicionada de farelo de soja

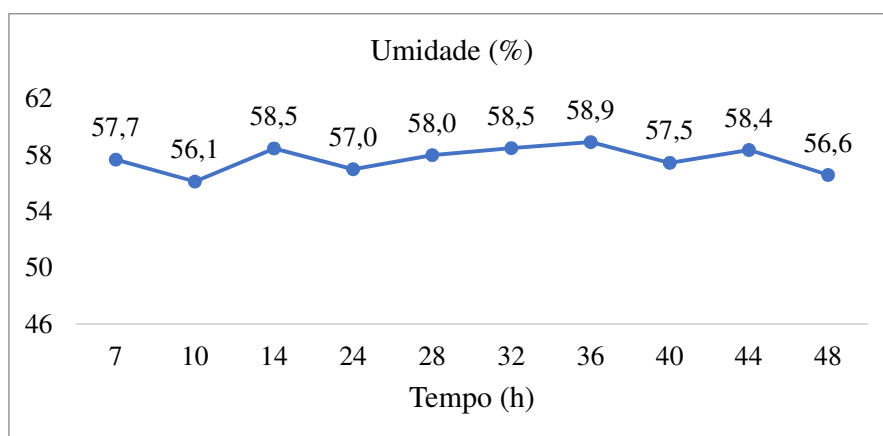


Figura 31: Perfil de umidade após 48 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja

Na fermentação com andiroba adicionada de farelo de soja, observou-se que a umidade não apresentou variação significativa, pois no início da fermentação o valor foi medido em 58,2% e, após 48 horas de fermentação, foi de 56,0%. A média de todos os valores foi de 57,7%.

No experimento em que o cupuaçu adicionado de farelo de soja foi utilizado, a primeira leitura de umidade apresentou o valor de 57,7%, chegando a 56,5% após 48 horas de fermentação. A média todos os valores foi de 57,7%

Essas medições demonstram que as matérias-primas utilizadas foram eficientes em reter a água durante toda a fermentação e, consequentemente, a *Yarrowia lipolytica* não foi submetida a estresse hídrico que comprometesse seu metabolismo. Além disso, pode-se concluir que a estufa incubadora BOD foi eficiente em manter a umidade do meio de fermentação durante todo o período de tempo necessário.

Durante a primeira etapa de fermentação com suplementação, a umidade foi medida seguindo o mesmo procedimento. Foram analisadas, em duplicatas, amostras da torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja, cujos valores médios são apresentados na Figura 32.

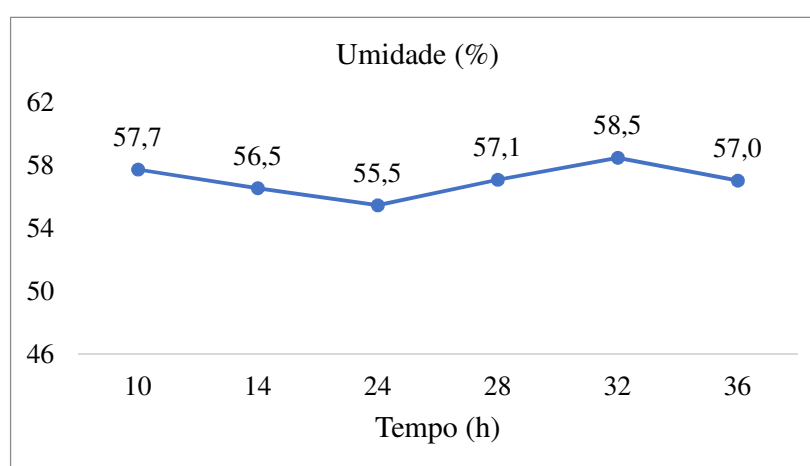


Figura 32: Perfil de umidade em 36 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja e suplementação externa

Na fermentação em que o cupuaçu adicionado de farelo de soja foi utilizado como fonte de nutrientes, observou-se que a umidade não apresentou variação significativa, já que no início da fermentação o valor foi medido em 57,7% e, após 48 horas de fermentação, foi de 57,0%. A média todos os valores foi de 57,1%, valor semelhante ao observado nos experimentos não suplementados.

É possível concluir, portanto, que a substituição da água destilada pela emulsão de suplementação, que contém ureia, peptona, glicose e óleo de soja, não alterou significativamente o valor da umidade média da torta no experimento. Da mesma forma que na fermentação não suplementada, a estufa incubadora BOD foi eficiente em manter a umidade do meio de fermentação durante o período de tempo do experimento.

Na literatura, encontra-se a sugestão de que o excesso de umidade afeta negativamente as propriedades físicas do substrato, causando a aglutinação das partículas e consequente ineficiência de transferência de oxigênio. Por outro lado, níveis de umidade abaixo do ideal prejudicam o crescimento microbiano devido ao insuficiente inchaço das partículas. IMANDI e companheiros, 2010 encontraram atividade lipolítica máxima quando *Y. lipolytica* foi cultivada em torta de palma a 70% de umidade inicial. MOFTAH e companheiros, 2013 obtiveram maior produção de lipases quando cultivou *Y. lipolytica* em resíduos do processamento do óleo de oliva a 55% de umidade. Observa-se que os requisitos de umidade não dependem apenas dos microrganismos empregados, mas também do tipo de substrato, especialmente no tocante a sua capacidade de retenção de água.

6.4. Produção de lipases por *Y. lipolytica* por FES na ausência de suplementação

Inicialmente, avaliou-se a viabilidade da produção de lipase, por *Yarrowia lipolytica*, em fermentação no estado sólido utilizando as tortas de cupuaçu e andiroba, sem nenhuma forma de suplementação. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 33 e 34.

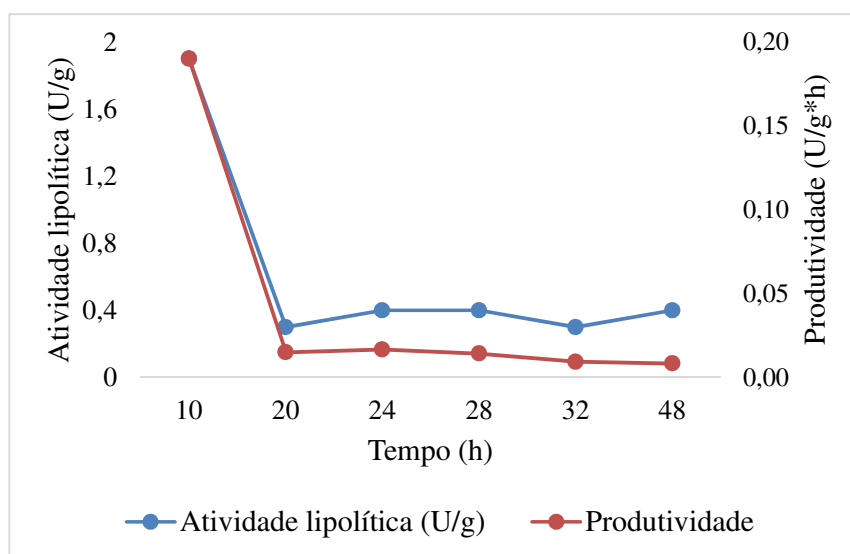


Figura 33: Atividade lipolítica e produtividade após 48 horas de fermentação em torta de cupuaçu

É possível observar que a curva que representa a atividade lipolítica tem tendência descendente durante as 48 horas de fermentação. O maior valor foi observado após 10

horas de fermentação, 1,9 U/g, e a partir de 20 horas, a atividade apresentou valores inferiores a 0,5 U/g.

A produtividade foi calculada dividindo-se o valor da atividade lipolítica pelo tempo de fermentação em cada um os pontos. O maior valor foi calculado em 10 horas de experimento e foi igual a 0,2 U/g.h.

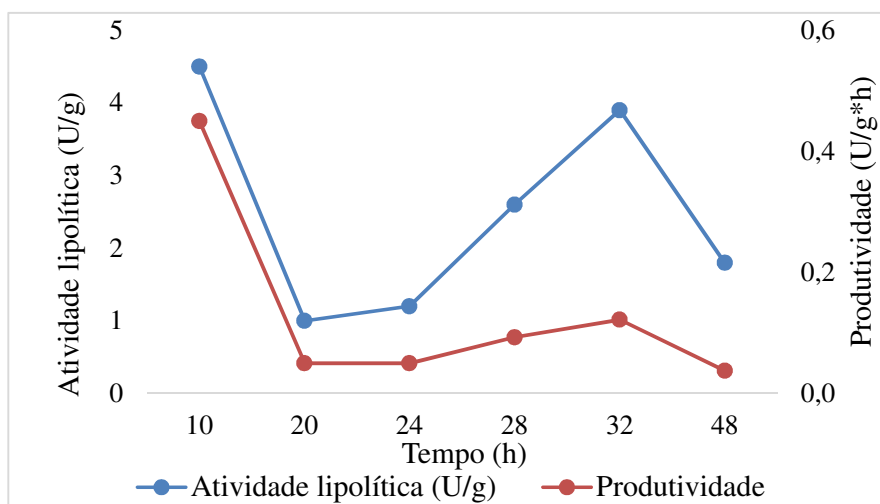


Figura 34: Atividade lipolítica e produtividade após 48 horas de fermentação em torta de andiroba

Observa-se que a curva que representa a atividade lipolítica tem tendência semelhante a da fermentação em cupuaçu. O maior valor foi observado após 10 horas de fermentação, 4,5 U/g, e a partir de 20 horas, a atividade apresentou valores inferiores a 4,0 U/g. O maior valor de produtividade foi calculado em 10 horas de experimento e foi igual a 0,5 U/g.h.

Diversos autores avaliaram a produção de lipases por fermentação no estado sólido utilizando co-produtos da agroindústria e obtiveram atividade lipolítica superior. KAMINI (1998) utilizou *A. niger* MTCC2594 em torta de gergelim e obteve atividade lipolítica de 363,6 U/g. DOMINGUEZ (2003) observou atividade de 69 U/g ao conduzir a FES em farelo de trigo por *Y. lipolytica*. KEMPKA (2008) conduziu a fermentação por *P. verrucosum* em farelo de soja e obteve atividade de 40 U/g. Esses resultados indicam que as tortas de cupuaçu e andiroba na ausência de qualquer forma de suplementação não foram substratos adequados para *Y. lipolytica*, provavelmente pela sua baixa capacidade de reter

a água presente no meio de fermentação e, por isso, decidiu-se por estudar a suplementação das tortas com farelo de soja.

6.5. Produção de lipases por *Y. lipolytica* por FES utilizando suplementação com farelo de soja

Buscou-se avaliar a viabilidade da produção de lipase, por *Yarrowia lipolytica*, em fermentação no estado sólido utilizando as tortas de cupuaçu e andiroba adicionadas de farelo de soja, sem nenhuma outra forma de suplementação externa. Além disso, buscou-se comparar as atividades lipolítica e proteolítica, bem como a produtividade de ambas as enzimas, dos extratos brutos para determinar qual das tortas seria mais eficiente e, assim, seguir para as próximas etapas do planejamento experimental com o objetivo de otimizar ainda mais a produção por meio da suplementação externa da torta escolhida.

Os valores de atividade lipolítica e produtividade calculados para cada um dos intervalos de tempo na fermentação que teve a torta de cupuaçu como fonte principal de nutrientes encontram-se na Figura 35.

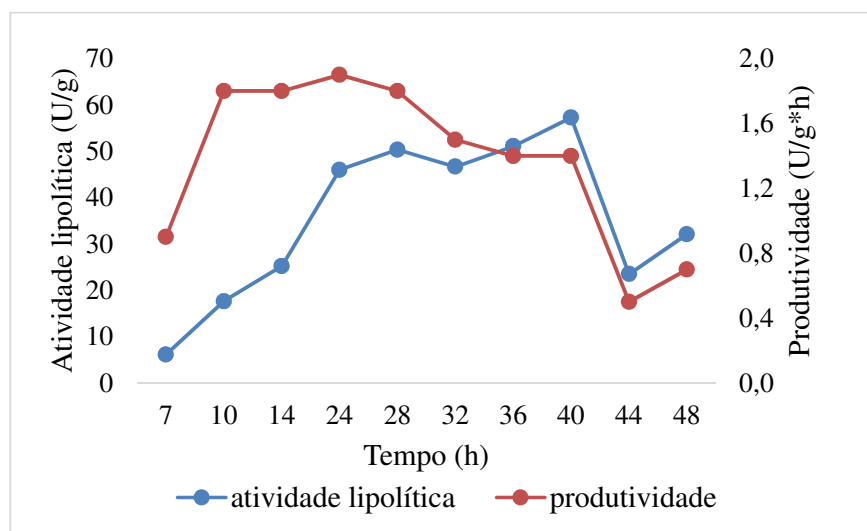


Figura 35: Atividade lipolítica e produtividade após 48 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja

É possível observar que a curva que representa a atividade lipolítica tem tendência ascendente durante as primeiras 40 horas de fermentação e, após esse tempo, é

drasticamente reduzida, chegando ao valor de 32,1 U/g ao final das 48 horas de experimento. O máximo valor observado ocorreu após 40 horas e foi de 57,3 U/g.

Observa-se que as maiores produtividades ocorreram no início da fermentação, tendo os maiores valores atingidos entre 10 e 28 horas e, a partir de 32 horas de fermentação teve tendência descendente, até atingir o valor de 0,7 U/g.h ao final das 48 horas. O maior valor calculado ocorreu após 24 horas (1,9 U/g.h). A redução da atividade enzimática após 40 horas de fermentação pode ser explicada pela ação das proteases, que hidrolisam as lipases, moléculas de estrutura proteica.

Os valores de atividade proteolítica e produtividade calculados para cada um dos intervalos de tempo na fermentação que teve a torta de cupuaçu como fonte principal de nutrientes encontram-se na Figura 36.

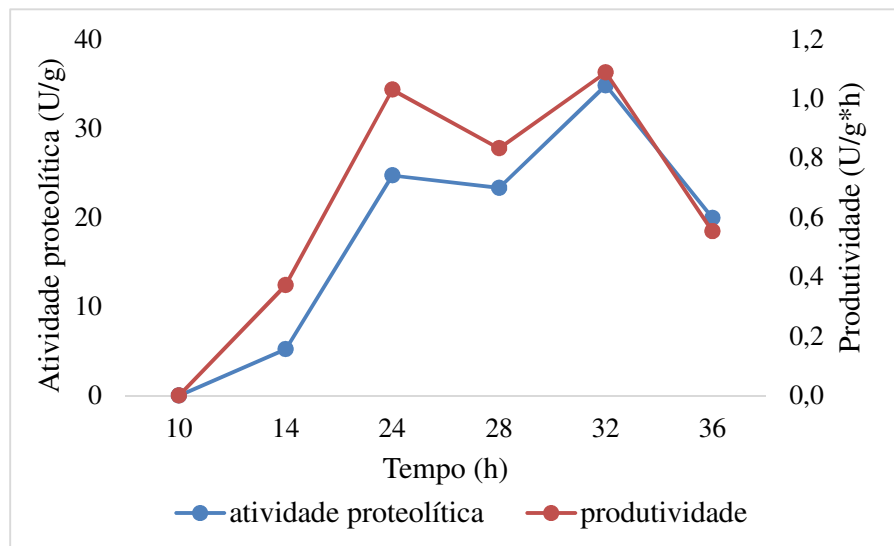


Figura 36: Atividade proteolítica e produtividade em 36 horas de fermentação em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja

Observa-se que a curva que representa a atividade proteolítica tem tendência ascendente durante as primeiras 32 horas de fermentação e, após esse tempo, é drasticamente reduzida, chegando ao valor de 19,9 U/g ao final de 36 horas de experimento. O máximo valor observado ocorreu após 32 horas e foi de 34,8 U/g.

Em relação à produtividade, é possível observar que os maiores valores ocorreram na segunda metade da fermentação, tendo os maiores valores atingidos entre 24 e 32 horas e que, a partir da hora 32 teve tendência descendente, até atingir o valor de 0,6 U/g.h ao final das 36 horas. O maior valor calculado ocorreu após 32 horas (1,1 U/g.h).

Os valores de atividade lipolítica e produtividade calculados para cada um dos intervalos de tempo na fermentação que teve a torta de andiroba como fonte principal de nutrientes encontram-se na Figura 37.

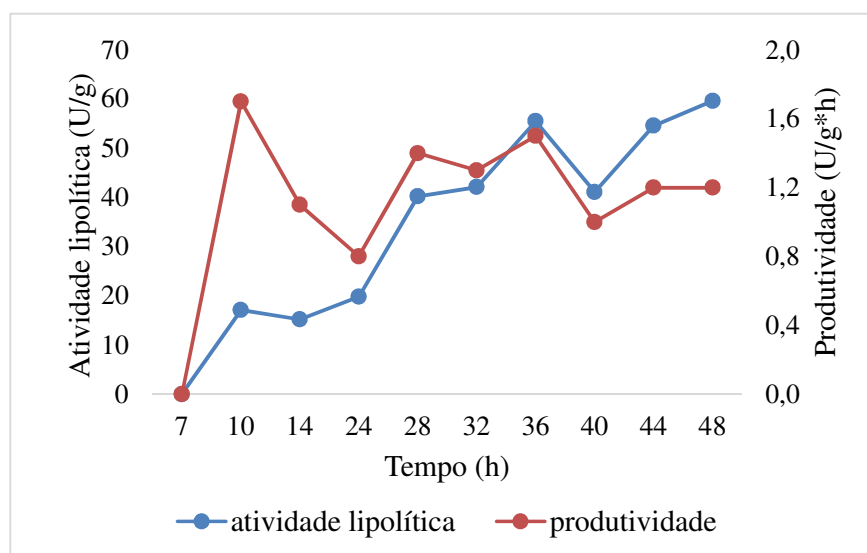


Figura 37: Atividade lipolítica e produtividade em 48 horas de fermentação em torta de andiroba adicionada de farelo de soja

É possível observar que a curva que representa a atividade lipolítica tem tendência ascendente durante as 48 horas de fermentação, quando atinge o máximo valor observado, que foi calculado em 59,6 U/g.

Em adição a isso, observou-se que a maior produtividade ocorreu no início da fermentação, tendo seu pico após 10 horas, quando ocorreu o maior valor calculado, de 1,7 U/g.h. Seguiu-se a isso, uma etapa de decréscimo da produtividade até a 24ª hora de experimento. Entre as horas 28 e 48, o valor da produtividade se manteve oscilante em torno de uma média de 1,3 U/g.h até atingir o valor de 1,2 U/g.h ao final das 48 horas.

Os valores de atividade proteolítica e produtividade calculados para cada um dos intervalos de tempo na fermentação que teve a torta de andiroba como fonte principal de nutrientes encontram-se na Figura 38.

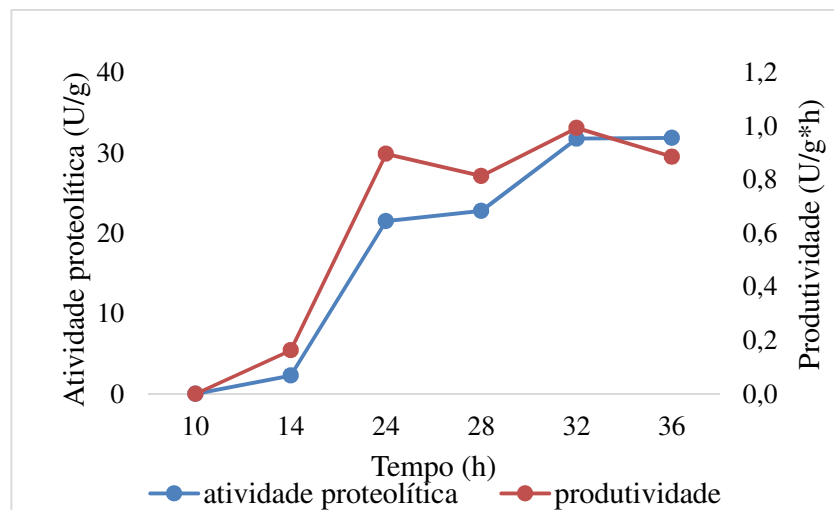


Figura 38: Atividade proteolítica e produtividade em 36 horas de fermentação em torta de andiroba adicionada de farelo de soja

Foi observado que a curva que representa a atividade proteolítica tem tendência ascendente durante as 36 horas de fermentação analisadas, quando atinge seu máximo valor, de 31,9 U/g.

Em relação à produtividade, é possível observar que os maiores valores ocorreram na segunda metade da fermentação, tendo os maiores valores atingidos entre 24 e 36 horas. O valor máximo calculado ocorreu em 32 horas de experimento e foi de 1,0 U/g.h. Esses dados mostram-se compatíveis com o esperado, tendo em vista que nas primeiras horas ocorre a fase “lag” do crescimento microbiano, no qual o mesmo se adapta às condições do meio, não havendo divisão celular.

Conclui-se, assim, que a levedura teve ambiente adequado, em termos de umidade, pH e acesso a nutrientes, pois foi capaz de produzir lipases e proteases extracelulares ao longo das 48 horas de experimento. Comparativamente, as atividades lipolíticas foram muito superiores às observadas na etapa anterior, na ausência de farelo de soja, confirmando a hipótese de que a capacidade deste suplemento de reter umidade foi determinante para o crescimento de *Y. lipolytica*.

Em ambos os casos, a queda da atividade lipolítica observada sugere a possibilidade da produção de proteases ter reduzindo os níveis de lipases extracelulares contidas no meio da fermentação, comportamento este observado em pesquisas anteriores sobre produção de lipases microbianas (DI LUCCIO et al., 2004; PALMA et al., 2000; GOMBERT et al., 1999).

Conforme citado anteriormente, um dos objetivos do presente trabalho foi realizar uma análise comparativa entre as duas matérias primas que, adicionadas do farelo de soja, foram utilizadas como matriz de fixação e fonte de carbono e nitrogênio para o microrganismo. A observação dos gráficos evidencia que tanto a andiroba quanto o cupuaçu foram biodisponíveis no fornecimento de nutrientes para a levedura, que apresentou crescimento e produção de lipases e proteases em ambos os casos.

Os máximos valores calculados de atividade lipolítica foram próximos para a andiroba e o cupuaçu: 59,6 U/g e 57,3 U/g, respectivamente. Em adição a isso, as produtividades da enzima apresentaram semelhanças, tendo seus maiores valores calculados em 1,7 U/g.h e 1,9 U/g.h para a andiroba e o cupuaçu, respectivamente.

A produtividade é um fator muito importante em um processo de interesse industrial, pois quanto maior ela for, menores são os custos unitários para cada unidade de produto final. Além disso, como a fermentação em estado sólido é realizada em processo de batelada, o fator tempo é determinante para a viabilidade econômica da planta, já que as bateladas ocorrem sequencialmente em um mesmo conjunto de equipamentos. Esse fato fez com que o cupuaçu, que apresentou o maior valor de produtividade calculado, fosse escolhido como a matéria-prima de melhor desempenho e usado nas etapas posteriores do planejamento experimental (tentativa de otimização do processo fermentativo para a produção de lipase): o planejamento experimental fatorial fracionário (PEFF) e o delineamento composto central rotacional (DCCR).

6.6. Planejamento experimental fatorial fracionário (PEFF)

Na etapa do planejamento experimental, a fermentação foi realizada utilizando a torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja com um tempo de fermentação fixado em 14 horas. A atividade lipolítica foi medida pelo método titulométrico e os resultados encontram-se na Tabela 11.

Para o modelo gerado o coeficiente de regressão (R^2) foi de 0,87, indicando que 87 % de variância pode ser explicada para o modelo gerado para a produção de lipase em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja.

Tabela 11: Parâmetros e atividade lipolítica em cada ensaio do planejamento experimental fatorial fracionário

Ensaio	Umidade (%)	Volume de inóculo (mL)	Ureia (%)	Peptona (%)	Glicose (%)	Óleo de soja (%)	Atividade lipolítica (U/g)
1	50,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,5
2	60,0	1,0	0,0	0,0	2,0	0,0	19,3
3	50,0	3,0	0,0	0,0	2,0	2,0	40,2
4	60,0	3,0	0,0	0,0	0,0	2,0	36,4
5	50,0	1,0	2,0	0,0	2,0	2,0	40,2
6	60,0	1,0	2,0	0,0	0,0	2,0	20,6
7	50,0	3,0	2,0	0,0	0,0	0,0	80,3
8	60,0	3,0	2,0	0,0	2,0	0,0	48,6
9	50,0	1,0	0,0	2,0	0,0	2,0	60,3
10	60,0	1,0	0,0	2,0	2,0	2,0	30,6
11	50,0	3,0	0,0	2,0	2,0	0,0	78,0
12	60,0	3,0	0,0	2,0	0,0	0,0	103,8
13	50,0	1,0	2,0	2,0	2,0	0,0	61,9
14	60,0	1,0	2,0	2,0	0,0	0,0	37,4
15	50,0	3,0	2,0	2,0	0,0	2,0	84,6
16	60,0	3,0	2,0	2,0	2,0	2,0	81,4
17(c)	55,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	72,4
18(c)	55,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	70,0
19(c)	55,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	80,5

O diagrama de Pareto disposto na Figura 39 evidenciam quais foram as variáveis e suas interações estatisticamente relevantes para a atividade enzimática dos extratos brutos de lipase.

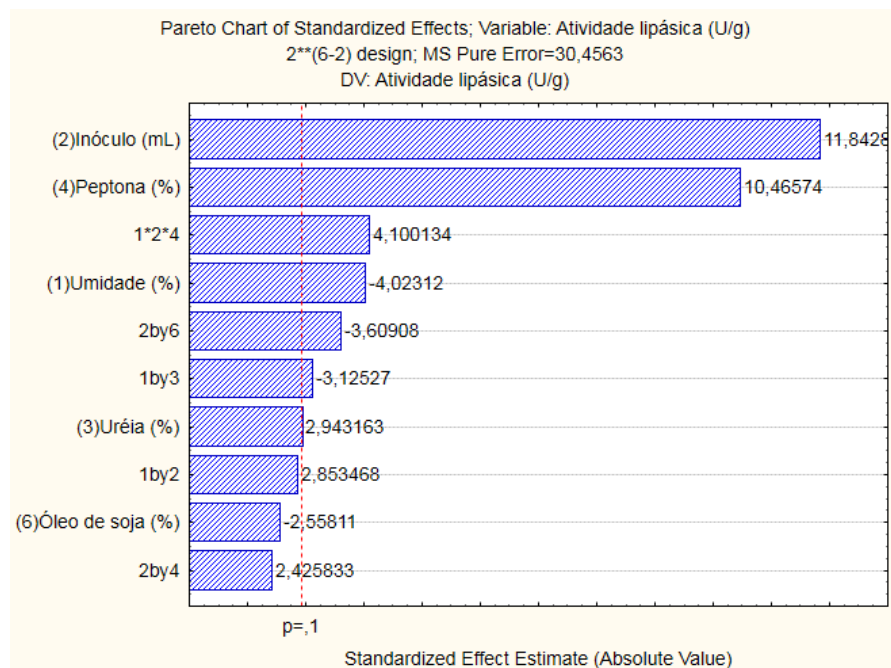


Figura 39: Diagrama de Pareto obtido no Planejamento Experimental Fatorial Fracionário

Dentro das condições testadas para o extrato bruto de lipase obtido em torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja, o termo linear das variáveis volume de inóculo (mL), peptona (%), umidade (%) e ureia (%) foram relevantes, sendo o termo linear de volume de inóculo (mL) o que obteve maior significância. As interações de segunda ordem que apresentaram relevância foram entre os parâmetros volume de inóculo com óleo de soja e umidade com percentual de ureia. Além disso, a interação de terceira ordem entre umidade, volume de inóculo e peptona também apresentou expressiva relevância no tratamento dos dados deste planejamento experimental.

O parâmetro óleo de soja, bem como sua interação quadrática com umidade e peptona não apresentaram significância segundo as premissas consideradas, pois o valor de p foi menor do que 0,1.

Ao comparar os resultados obtidos nessa etapa com os da etapa anterior, na qual não houve suplementação externa, é possível verificar 81% de aumento da atividade lipolítica, assim como outros autores, que demonstraram que diferentes fontes de nitrogênio usadas como suplementos em meios fermentativos podem aumentar consideravelmente a produção de lipases extracelulares. Pode-se citar a produção de

lipases microbianas por FES em torta de *Jatropha curcas* (MAHANTA et al., 2008), bagaço de cana (RODRIGUES et al., 2006) e torta de babaçu (GOMBERT et al., 1999).

6.7. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Na etapa do delineamento composto central rotacional, a fermentação foi realizada utilizando a torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja durante 24 horas, pois nesse intervalo de tempo obteve-se a maior produtividade de lipase na fermentação sem suplementação. De acordo com o observado no Planejamento Experimental Fatorial Fracionário, nessa etapa o volume de inóculo foi fixado em 3,0 mL (2,07 mg células / g torta/farelo seco) e a umidade foi mantida em 55%. Os parâmetros peptona (%), uréia (%) e óleo de soja (%) foram avaliados no DCCR. A atividade lipolítica foi mensurada pelo método titulométrico e os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Parâmetros e atividade lipolítica em cada ensaio do delineamento composto central rotacional

Ensaio	Peptona (%)	Uréia (%)	Óleo de soja (%)	Atividade lipolítica (U/g)
1	0,6	0,6	0,6	47,4
2	0,6	0,6	2,4	43,1
3	0,6	2,4	0,6	51,7
4	0,6	2,4	2,4	49,5
5	2,4	0,6	0,6	37,1
6	2,4	0,6	2,4	43,5
7	2,4	2,4	0,6	37,7
8	2,4	2,4	2,4	66,7
9	0,0	1,5	1,5	40,6
10	3,0	1,5	1,5	30,5
11	1,5	0,0	1,5	45,0
12	1,5	3,0	1,5	44,4
13	1,5	1,5	0,0	59,5
14	1,5	1,5	3,0	55,3
15(c)	1,5	1,5	1,5	58,3
16(c)	1,5	1,5	1,5	70,6
17(c)	1,5	1,5	1,5	65,1

A matriz experimental, presente na Tabela 12, foi avaliada pela análise da variância (ANOVA) em um intervalo de confiança de 90 % (valor de $p < 0,1$) para a fermentação utilizando a torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja. As superfícies de resposta geradas encontram-se nas Figuras 40, 41 e 42.

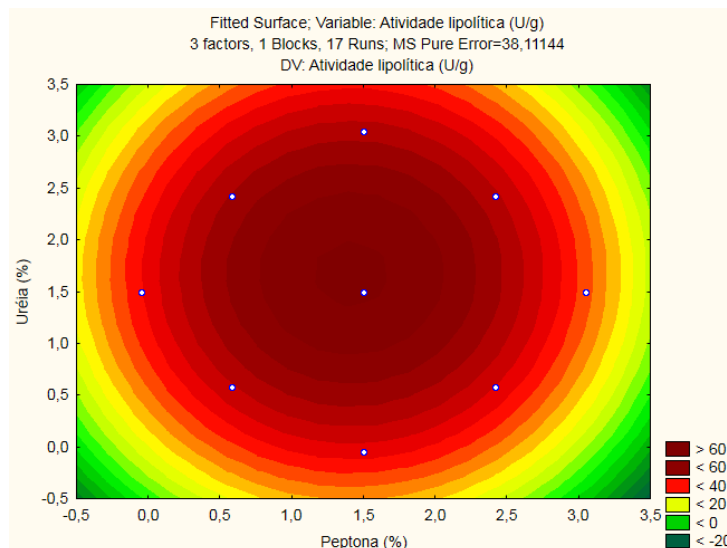


Figura 40: Superfície de resposta da atividade lipolítica em função das concentrações de uréia (%) e peptona (%) obtidas pelo DCCR para a fermentação da torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja

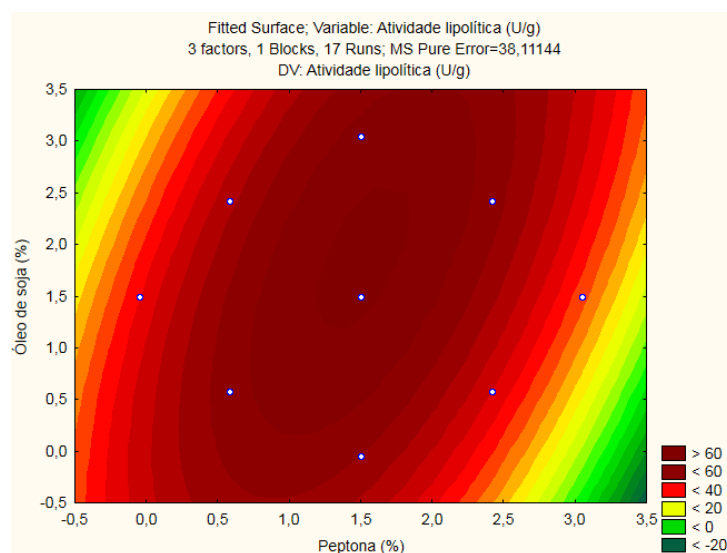


Figura 41: Superfície de resposta da atividade lipolítica em função das concentrações de óleo de soja (%) e peptona (%) obtidas pelo DCCR para a fermentação da torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja

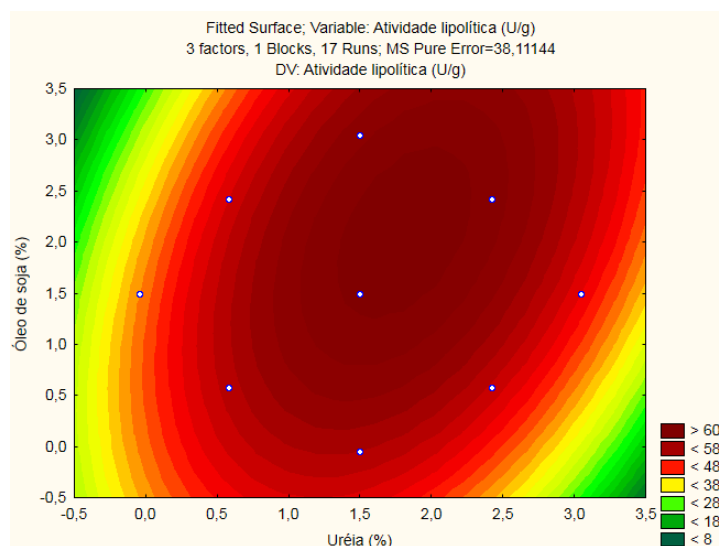


Figura 42: Superfície de resposta da atividade lipolítica em função das concentrações de óleo de soja (%) e uréia (%) obtidas pelo DCCR para a fermentação da torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja

É possível observar que todos os parâmetros foram estatisticamente significativos no delineamento. A peptona e a ureia apresentam intervalos de valores mais restritos, próximos a 1,5% em que a atividade lipolítica é maior que 60 U/g. Já o óleo de soja apresenta maior flexibilidade, com valores ótimos entre 1,5 e 3,0%, demonstrando que *Y. lipolytica* é menos sensível a esse parâmetro, conforme havia sido identificado no PEFF. As três superfícies de resposta indicam que a presença de uréia, óleo de soja e peptona têm efeitos negativos sobre a atividade lipolítica quando suas concentrações são muito elevadas, indicando a interferência negativa desses compostos na formação e na interações entre as células e as superfícies ou compostos hidrofóbicos, conforme discutido por AMARAL (2007).

O modelo DCCR analisa as superfícies de resposta de modo a calcular os valores críticos, ou seja, a composição ideal de cada um dos três parâmetros avaliados, considerando a interação entre eles. Os valores calculados encontram-se na Tabela 13 e a atividade lipolítica predita na composição ideal é de 65,6 U/g. Esse valor é próximo ao observado no ponto central do planejamento devido ao fato do DCCR fazer a análise da curvatura da superfície de resposta, indicando a região onde há maior probabilidade de encontrar a solução ótima. Fato semelhante foi observado por FONTES, 2008, que, ao investigar a influência da concentração de glicerol (% v/v), glicose (% m/v) e da razão de carbono/nitrogênio no delta de tensão superficial no processo de produção de biossurfactante

por *Y. lipolytica*, obteve valor máximo predito pelo modelo de 19,55 mN/m enquanto uma das leituras do ponto central foi de 20,11 mN/m.

Tabela 13: Composição ideal predita pelo DCCR para cada um dos parâmetros avaliados

Parâmetro	Valor crítico
Peptona (%)	1,63
Ureia (%)	1,86
Óleo de soja (%)	2,29

Em comparação com a primeira etapa de fermentação, no qual não houve suplementação das tortas de andiroba e cupuaçu, é possível concluir que a suplementação com farelo de soja, uréia, peptona e óleo de soja influenciaram positivamente na produção de lipases por *Y. lipolytica*, pois nas etapas do planejamento experimental foram obtidos valores de atividade lipolítica da ordem de 100 U/g, 50 vezes maior do que o observado na fase não suplementada.

7. CONCLUSÕES

Dentre as matérias-primas utilizadas como matriz de fixação e, principalmente, fonte de nutrientes para a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, pode-se concluir que a andiroba (4,5 U/g) e o cupuaçu (1,9 U/g) foram incapazes de reter umidade suficiente para que ocorresse a produção dessas enzimas. Ao adicionar o farelo de soja, tanto a fermentação em torta de andiroba quanto na de cupuaçu apresentaram atividade lipolítica durante todo o tempo do experimento (com valores máximos de 59,6 U/g e 57,3 U/g, respectivamente), pois juntas essas matérias-primas foram capazes de reter umidade e disponibilizar os substratos para a levedura. Ao comparar as duas matérias-primas, observou-se que a torta de cupuaçu adicionada de farelo de soja apresentou melhores produtividades enzimáticas, motivo pelo qual ela foi usada nas etapas posteriores do planejamento experimental.

Ao adicionar a suplementação externa, conseguiu-se alcançar atividades enzimáticas ainda maiores. No planejamento experimental fatorial fracionário, avaliou-se a influência dos parâmetros umidade, volume de inóculo, peptona (%), óleo de soja (%), glicose (%), uréia (%) e o maior valor de atividade lipolítica mensurado foi de 103,8 U/g, após 14 horas de fermentação, utilizando apenas a peptona como fonte complementar de nutrientes e 3,0 mL de extrato enzimático. O modelo usado apontou como parâmetros de maior significância o volume de inóculo, a umidade e a concentração de peptona.

Posteriormente, foi realizado o delineamento composto central rotacional para calcular a concentração de uréia, peptona e óleo de soja ideais na solução de suplementação. Os valores de umidade e volume de inóculo foram mantidos constantes em 55% e 3,0 mL, respectivamente. A maior atividade lipolítica foi observada em uma das repetições do ponto central, que continha 1,5% de cada um dos três parâmetros avaliados. O modelo identificou que as concentrações ideais serão 2,63% de peptona, 1,86% de uréia e 2,29% de óleo de soja, cuja atividade lipolítica será de 65,6 U/g.

Assim, conclui-se que as tortas de andiroba e cupuaçu e o farelo de soja, considerados co-produtos da agroindústria, podem ser usados como fontes de nutrientes na produção de lipases por *Y. lipolytica* em fermentação no estado sólido. Esse processo pode ser empregado na indústria em substituição à fermentação submersa, principalmente em países com abundância de biomassa como o Brasil, pois os custos dessas matérias-primas são menores que os das usadas tradicionalmente, além de simplificarem etapas posteriores de purificação do produto final e gerarem menos resíduos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Solid substrate fermentations. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, 1982. p. 201-237.

ALONSO FOM, Oliveira EBL, Dellamora-Ortiz GM, Pereira-Meirelles FV. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazil J Chem Eng**22(1): 9–18, 2005.

AMARAL, PFF. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em Biorreator Multifásico. **Tese de Doutorado. Tese (Doutorado)–Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos–EQ**, 220 p. 29, 7 cm, 2007.

BARTH, Gerold; GAILLARDIN, Claude. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS microbiology reviews**, v. 19, n. 4, p. 219-237, 1997.

BARTH, Wilmar Luiz. Engenharia genética e bioética. **Teocomunicação**, v. 35, n. 149, 2005.

CALZAVARA, Batista Benito G.; MÜLLER, C. H.; KAHWAGE, O. de N. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 1984.

CAMPOS, I. Padrões recentes de evolução da economia na Amazônia. **Belém: UFP**, nov, 2009.

CHEN, Juan-Yan; WEN, Chih-Min; CHEN, Teh-Liang. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 62, n. 3, p. 311-316, 1999.

CORDOVA, Armando et al. Synthesis of a poly (ϵ -caprolactone) monosubstituted first generation dendrimer by lipase catalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 51, p. 13521-13522, 1998.

CORZO, Gerardo; REVAH, Sergio. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource technology**, v. 70, n. 2, p. 173-180, 1999.

DE NAZARÉ, Raimunda Fátima Ribeiro; BARBOSA, W. C.; VIÉGAS, R. M. F. Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate. **Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1990.

DIAZ, J.C.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S. CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARREIRE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, 1042-1050, 2006.

DI LUCCIO, Marco et al. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113, n. 1-3, p. 173-180, 2004.

DOMINGUEZ, A. et al. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 15, p. 1225-1229, 2003.

DUCKE, Adolfo. Plantas de cultura precolombiana na Amazônia brasileira: notas sobre as espécies ou formas espontâneas que supostamente lhes teriam dado origem. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1946.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 113-125, 2003.

DUTRA, Keilla dos Reis. Transição Dimórfica em *Yarrowia lipolytica*: ação da auxina e óxido nítrico, 2010.

ELIBOL, Murat; OZER, Dursun. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 367-372, 2002.

FARIAS, José Renato B.; NEPOMUCENO, Alexandre L.; NEUMAIER, Norman. Ecofisiologia da soja. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.

FARIAS, M. A. et al. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* in solid state fermentation using different agro industrial residues. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 301-306, 2014.

FLORES, Carmen-Lisset et al. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 507-529, 2000.

FONTES, G. C. Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. **Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ, Rio de Janeiro**, 2008.

FREIRE, Denise M. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, 1997. p. 409-421.

GERIS, Regina et al. Biodiesel de soja-reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1369, 2007.

GOMBERT, Andreas K. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1-2, p. 85-90, 1999.

GORDILLO, M. A. et al. Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operational strategies. **Biotechnology and bioengineering**, v. 60, n. 2, p. 156-168, 1998.

GRIEBELER, N.; POLLONI, A.E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHE, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW, J. L. Isolation and screening of lipaseproducing fungi with hydrolytic activity, **Food and Bioprocess Technology**, 2009.

GUERZONI, M. E. et al. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. **International journal of food microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 79-89, 2001.

GUTARRA, Melissa LE et al. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 82, n. 3, p. 313-318, 2007.

HAMMER, M. L., et al. "Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil)." **J. Ethnopharmacol.**, 40(1): 53-75, 1993.

HEMACHANDER, C.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 809-814, 2000.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, IÊDA CARVALHO. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja- Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

IMANDI, Sarat Babu; KARANAM, Sita Kumari; GARAPATI, Hanumantha Rao. Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation

by *Yarrowia lipolytica* from palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*). **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, n. 02, p. 115, 2010.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.

JAEGER, Karl-Erich; REETZ, Manfred T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JORGE, Neuza et al. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. **Química Nova**, p. 947-951, 2005.

JUCCA, Lisa; AKIN, Melissa. Europe Presses Russia on Euro. **Moscow Times**, 2003.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KAMZOLOVA, Svetlana V. et al. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. **FEMS yeast research**, v. 3, n. 2, p. 217-222, 2003.

KEMPKA, Anieli Pinto et al. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008.

LOPES, V. R. O. et al. Nitrogen sources on TPOMW valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 261-270, 2016.

MADZAK, Catherine; GAILLARDIN, Claude; BECKERICH, Jean-Marie. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. **Journal of Biotechnology**, v. 109, n. 1-2, p. 63-81, 2004.

MAHADIK, Nutan D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAHANTA, Nilkamal; GUPTA, Anshu; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource technology**, v. 99, n. 6, p. 1729-1735, 2008.

MANOEL, Evelin A. et al. On the kinetic resolution of sterically hindered myo-inositol derivatives in organic media by lipases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, n. 1, p. 47-52, 2012.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 11, n. 6, p. 1300-1311, 2007.

MENDONÇA, Layanne Andrade. Desempenho do delineamento composto central rotacional em experimentos com alto coeficiente de variação. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa**, 2012.

MOFTAH, Omar AS et al. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. **J Serb Chem Soc**, v. 78, n. 6, p. 781-794, 2013.

MÜLLER, Sven et al. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, v. 14, n. 14, p. 1267-1283, 1998.

MURALIDHAR, R. V.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Lipases in racemic resolutions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 76, n. 1, p. 3-8, 2001.

NEUMAIER, N. et al. Estádios de desenvolvimento da cultura de soja. **Estresses em soja. Passo Fundo: Embrapa Trigo**, p. 19-44, 2000.

NICAUD, Jean-Marc et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 3, p. 371-379, 2002.

NEVES, Orlando Sílvio Caires et al. Crescimento, produção de matéria seca e acúmulo de N, P, K, Ca, Mg e S na parte aérea de mudas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) cultivadas em solo de várzea, em função de diferentes doses de fósforo. **Revista Árvore**, v. 28, n. 3, p. 343-349, 2004.

OKAZAKI, Shin-ya et al. Enantioselective esterification of glycidol by surfactant-lipase complexes in organic media. **Biotechnology letters**, v. 19, n. 6, p. 541-543, 1997.

OLIVEIRA, Pedro Henrique Santos. Análise fisiológica e cinética do crescimento da levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em diferentes fontes de carbono. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**, 2014.

PALMA M.B., PINTO A.L., GOMBERT A.K., SEITZ K.H., KIVATINITZ S.C., CASTILHO L.R., FREIRE, D.M.G. Lipase Production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochem. And Biotechnology*, 84-86, 2000.

PEREIRA-MEIRELLES, Fatima Ventura; ROCHA-LEÃO, Maria Helena Miguez; SANT'ANNA, Geraldo Lippel. A stable lipase from *Candida lipolytica*. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, p. 73-85, 1997.

PINHO, David MM; SUAREZ, Paulo AZ. A hidrogenação de óleos e gorduras e suas aplicações industriais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 47-62, 2013.

PINTO, G. A. S. Produção de uma mistura enzimática hidrolítica por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa. **Dissertação (Mestrado), Curso de PósGraduação em Bioquímica, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, UFRJ**, 100 p., 1998.

PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra et al. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2005.

PUTHLI, Meenal S.; RATHOD, Virendra K.; PANDIT, Aniruddha B. Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 25-30, 2005.

RIGO, Elisandra et al. Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. 2009.

RODRIGUES, Sueli; DORNELLES, Anita Saraiva. Fermentação alcoólica de caldo de cana utilizando grãos de kefir. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 3, p. 386-390, 2006.

SAMPAIO, P. de TB; CLAY, JW; CLEMENT, CR. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. **Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico**, p. 243-251, 2000.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. et al. Importance of medium pH in solid state fermentation for growth of *Schwanniomyces castellii*. **Letters in applied microbiology**, v. 15, n. 4, p. 164-167, 1992.

SCIOLI, Custode; VOLLARO, Lucia. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. **Water Research**, v. 31, n. 10, p. 2520-2524, 1997.

SEDIYAMA, Aline Fumie et al. Análise da estrutura, conduta e desempenho da indústria processadora de soja no Brasil no período de 2003 a 2010. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 51, n. 1, p. 161-182, 2013.

SHARMA, Rohit; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam Chand. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SINGHANIA, Reeta Rani et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SOCHA, Lucimar Batista; A PINHEIRO, Rosa Beatriz Madruga. Cupuaçu: a fruta globalizada. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 4, n. 2, p. 554-567, 2015.

SOUZA, Carlos EC et al. Adding Value to Agro-industrial Co-products from Canola and Soybean Oil Extraction Through Lipase Production Using *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 4, p. 1163-1176, 2017.

SZABO, R. Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. **Folia microbiologica**, v. 44, n. 1, p. 19-24, 1999.

SZABO R, ŠTOFANÍKOVÁ V. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiol Lett** 206:45–50, 2002.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I.; WIECZOREK, J. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 8, p. 492-497, 1988.

TONINI, Helio; COSTA, Patricia da; KAMISKI, Paulo Emilio. Estrutura, distribuição espacial e produção de sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) no sul do estado de Roraima. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 3, p. 247-255, 2009.

TSUGAWA, Ryuichiro et al. Fermentation of n-Paraffins by Yeast: Part III. α -Ketoglutarate Productivity of Various Yeast. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 929-938, 1969.

UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, 37, 637-641, 2002.

VARGAS, G.D.L.P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S.C.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicicium* in soybean meal. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, 83, 47-54, 2008.

WHITAKER J.R. Principles Of Enzymology For The Food Sciences. **Marcel Dekker Inc. NY**, pp. 481–501, 1972.

WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 771, 1990.

YONG-HONG, L. I. et al. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 650-656, 2006.

ZAMBOM, Maximiliane Alavarse et al. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.